



**(11) PI 0615397-6 B1**

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

**(22) Data do Depósito:** 25/08/2006

**(45) Data de Concessão:** 03/10/2023

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(54) Título:** ANTICORPO ANTI-CD20, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE O CONTÉM E USO DO MESMO

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/28; C12N 15/13; C12N 5/10; A61K 39/395; A61P 35/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 26/08/2005 US 60/711,454.

**(73) Titular(es):** ROCHE GLYCART AG.

**(72) Inventor(es):** EKKEHARD MÖSSNER; PABLO UMANA.

**(86) Pedido PCT:** PCT IB2006003294 de 25/08/2006

**(87) Publicação PCT:** WO 2007/031875 de 22/03/2007

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 27/02/2008

**(57) Resumo:** MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO MODIFICADA, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO QUE CODIFICA UM POLIPEPTÍDEO, VETOR, MÉTODO DE PRODUÇÃO DA REFERIDA MOLÉCULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE A CONTÉM, BEM COMO USO DA MESMA. A presente invenção refere-se à moléculas de ligação a antígeno-modificadas (ABMs). Em modalidades particulares, a presente invenção se refere a anticorpos monoclonais recombinantes ou fragmentos, incluindo anticorpos quiméricos, primatizados ou humanizados ou fragmentos, tendo capacidade alterada de mediar a atividade de sinalização celular através de um antígeno-alvo e/ou capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo. Além disso, a presente invenção se refere à moléculas de ácido nucléico que codificam tais ABMs modificadas e vetores e células hospedeiras compreendendo tais moléculas de ácido nucléico. A invenção ainda se refere a métodos para produção das ABMs modificadas da invenção e a métodos de uso dessas ABMs modificadas no tratamento de doenças. Além disso, a presente invenção se refere à ABMs modificadas com glicosilação modificada tendo propriedades terapêuticas aperfeiçoadas, incluindo anticorpos com ligação aumentada ao receptor Fc e função efetuidora aumentada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"ANTICORPO ANTI-CD20, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE O  
CONTÉM E USO DO MESMO".**

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se refere à moléculas de ligação a antígeno (ABMs). Em modalidades particulares, a presente invenção se refere a anticorpos monoclonais recombinantes ou fragmentos, incluindo anticorpos ou fragmentos quiméricos, primatizados ou humanizados, tendo capacidade alterada de mediar a atividade de sinalização celular por um antígeno-alvo e/ou capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo. Além disso, a presente invenção se refere à moléculas de ácido nucléico que codificam tais ABMs e vetores e células hospedeiras compreendendo tais moléculas de ácido nucléico. A invenção ainda se refere a métodos para produção das ABMs da invenção e a métodos de uso dessas ABMs no tratamento de uma doença. Além disso, a presente invenção se refere à ABMs com glicosilação modificada tendo propriedades terapêuticas aperfeiçoadas, incluindo anticorpos com ligação aumentada ao receptor Fc e função efetuada aumentada.

Antecedente da Técnica

[0002] Anticorpos, também denominados imunoglobulinas, têm uma estrutura básica compreendendo quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (H) idênticas emparelhadas com duas cadeias leves (L) idênticas. Cada cadeia pesada e leve compreende uma região variável (VH e VL, respectivamente) e uma região constante (CH e CL, respectivamente). A região CH tem 3 domínios (CH1, CH2 e CH3), enquanto que a menor região CL tem apenas um domínio (simplesmente referido como CL). Cada região VH e LH compreende 3 regiões de determinação de complementaridade (CDRs) flanqueadas

por 4 regiões de "framework" na seguinte ordem: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3- CDR3-FR4. As CDRs são a parte mais variável da região V e determinam a especificidade por antígeno do anticorpo. Juntas, uma VH e VL emparelhadas formam o sítio de ligação a antígeno e anticorpos bivalentes têm dois de tais sítios de ligação a antígeno. Deve ser observado que essa estrutura básica de anticorpo pode ser modificada de várias formas (por exemplo, através de geração de fragmentos da estrutura) ao mesmo tempo em que retêm ou mesmo melhora funções desejadas e/ou a atividade de ligação a antígeno.

[0003] A interface entre os domínios a esse VH e CH1 compreende aminoácidos conservados. Essa área de contato pode ser descrita como "união molecular de esfera- e – soquete". Essa união determina o "movimento de cotovelo" e também o assim denominado "ângulo de cotovelo" das regiões VH e VL com relação às regiões CH1 e CL e impede que um contato rígido se forme entre as regiões V e C (Lesk e Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190)). O soquete da união em esfera – e – soquete é formada por resíduos de aminoácidos na região de "framework" VH, especificamente aqueles nas posições 11, 110 e 112 (de acordo com o sistema de numeração de Kabat e outros,(1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4<sup>a</sup> ed. (Public Health Services, NIH, Washington, DC)). (Vide Lesk e Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190). A "esfera" dessa união em esfera – e – soquete é encontrada no domínio CH1 e é formada principalmente pelos dois aminoácidos nas posições 148 e 149 (Vide Landolfi e outros, *J. Immunol.* (2001) 166: 1748-1754; Lesk e Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190) (em que os resíduos CH1 que formam a "esfera" são numerados 149 e 150, respectivamente). Diferenças nos aminoácidos nessas posições podem orientar o ângulo de cotovelo que é formado entre as regiões V e C e, portanto, a orientação do dímero VH-VL (vide Lesk e Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190).

Os resíduos de aminoácido que ocupam essas posições VH são altamente conservados entre as seqüências de imunoglobulina (vide, por exemplo, Lesk e Chothia, *Nature* (1988) 335(8): 188-190). Todos os resíduos envolvidos nessa união (por exemplo, posições 11, 110, 112, 148 e 149) estão localizados na região de "framework" (por exemplo, resíduos 11, 110 e 112) ou no domínio constante (por exemplo, 148 e 149 (de acordo com Landolf e outros; posições 149 e 150 de acordo com Lesk e Clothia) e não parecem estar diretamente envolvidos na ligação ao antígeno. Landolfi e outros, *J. Immunol.* (2001) 166: 1748-1754.

[0004] Além de mediar funções efetadoras, tais como citotoxicidade célula-mediada dependente (ADCC) e citotoxicidade complemento-dependente (CDC), anticorpos monoclonais podem modular funções celulares através de indução ou inibição das vias de sinalização celular. Por exemplo, foi mostrado que anticorpos monoclonais mediam a reticulação a antígeno, ativam receptores de morte (por exemplo, através de facilitação de oligomerização de receptores ou imitando a ligação ao ligante) e bloqueando a sinalização celular ligante-mediada em diferenciação de crescimento celular e/ou vias de proliferação (vide, por exemplo, Ludwig e outros, *Oncogene* (2003) 22: 9097- 9106).

[0005] A apoptose, ou morte celular programada, pode ser disparada por diversos mecanismos diferentes. Por exemplo, a ativação de vias de sinalização através de "receptores de morte" membrana celular-ligados, por exemplo, membros da superfamília do fator de necrose de tumor (TNFR), pode levar à indução de apoptose. Da mesma forma, dimerização ou reticulação de antígeno na superfície, por exemplo, CD20, pode também induzir à apoptose (vide, por exemplo, Ludwig e outros, *Oncogene* (2003) 22: 9097- 9106).

[0006] Permanece uma necessidade por abordagens terapêuticas

intensificadas que objetivam antígenos associados à sinalização celular incluindo, mas não limitado a, a indução de apoptose, para o tratamento de doenças em primatas incluindo, mas não limitado a, seres humanos.

#### Breve Sumário da Invenção

[0007] Reconhecendo o tremendo potencial terapêutico de moléculas de ligação antígeno (ABMs) modificadas que têm capacidade alterada de mediar a atividade de sinalização celular por um antígeno-alvo e/ou capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígeno-alvo, os presentes inventores desenvolveram tais ABMs, bem como um método para a produção de tais ABMs. *Inter alia*, esse método envolve produção de anticorpos quiméricos recombinantes ou fragmentos quiméricos dos mesmos. A eficácia dessas ABMs modificadas é ainda intensificada através de manipulação do perfil de glicosilação da região Fc do anticorpo.

[0008] Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção é dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreendendo pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido de uma molécula de ligação a antígeno precursora, em que a referida substituição resulta em atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo quando a referida molécula de ligação a antígeno-modificada está em complexo com o referido antígeno-alvo. Em uma modalidade particular, a atividade de sinalização celular alterada é apoptose. Em uma modalidade, a molécula de ligação a antígeno-modificada tem uma capacidade aumentada de induzir à apoptose. Em outra modalidade, a molécula de ligação a antígeno-modificada tem uma capacidade reduzida de induzir à apoptose.

[0009] Em outro aspecto, a invenção é dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo uma região variável de

cadeia pesada ou de cadeia leve compreendendo pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de *"framework"* da referida região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve quando comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma molécula de ligação a antígeno precursora, em que a referida molécula de ligação a antígeno tem capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo como um resultado da referida substituição.

[00010] Em uma modalidade, a molécula de ligação a antígeno-modificada da presente invenção compreende uma substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada. Em outra modalidade, a substituição compreende uma substituição selecionada do grupo consistindo em pelo menos 2, pelo menos 3 ou pelo menos 4 aminoácidos.

[00011] Em uma modalidade, a substituição compreende uma substituição da FR1 inteira da região variável de cadeia pesada. Em uma outra modalidade, a FR1 inteira é substituída por uma FR1 de VH de linhagem germinativa. Em modalidades particulares, a FR1 de VH de linhagem germinativa compreende uma sequência de aminoácido nas posições 8 a 13 de Kabat selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 e SEQ ID NO: 105.

[00012] Uma modalidade a ABMs modificada compreende uma substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada a qual compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 de Kabat.

[00013] Em uma modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 8 de Kabat. Em uma modalidade mais específica, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 8 de Kabat por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em arginina e glicina.

[00014] Em outra modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 9 de Kabat. Em uma modalidade mais específica, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 9 de Kabat por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em prolina, glicina, serina e histidina.

[00015] Em uma modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 10 de Kabat. Em uma modalidade mais específica, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 10 de Kabat por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em glutamato, treonina, glicina, alanina, e valina.

[00016] Em outra modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat. Em uma modalidade específica, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por qualquer resíduo de aminoácido, menos leucina. Em outra modalidade específica a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por um aminoácido não polar. Em outra modalidade específica, a substituição

compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em leucina, isoleucina, serina, e fenilalanina. Em uma modalidade particular, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por uma leucina.

[00017] Em outra modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 12 de Kabat. Em uma modalidade específica, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 12 de Kabat por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em lisina, valina, leucina, e isoleucina.

[00018] Em outra modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição dos resíduos de aminoácido nas posições 11 e 12 de Kabat. Em uma modalidade específica, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por uma valina e na posição 12 de Kabat por uma lisina; uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por uma leucina e na posição 12 de Kabat por uma valina; uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por uma valina e na posição 12 de Kabat por uma isoleucina; ou uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 11 de Kabat por uma valina e na posição 12 de Kabat por uma valina.

[00019] Em outra modalidade particular, a substituição na FR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 13 de Kabat. Em uma modalidade específica, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 13 de Kabat por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em lisina, arginina, glutamina e



glutamato.

[00020] Em outro aspecto da presente invenção, substituição na ABM compreende substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido na FR4 da região variável de cadeia pesada. Em uma modalidade particular, a substituição na FR4 da região variável de cadeia pesada compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 110 ou 112 de Kabat.

[00021] Em uma modalidade particular, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 110 de Kabat por um aminoácido selecionado do grupo consistindo em leucina, isoleucina, treonina ou serina. Em uma modalidade mais específica, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 110 de Kabat por uma isoleucina.

[00022] Em outra modalidade, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 112 de Kabat por um aminoácido selecionado do grupo consistindo em valina, leucina, isoleucina ou treonina. Em uma modalidade mais específica, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 112 de Kabat por uma isoleucina.

[00023] Em um aspecto, a presente invenção é ainda dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo um domínio CH1 compreendendo pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido quando comparado com o domínio CH1 de um polipeptídeo precursor, em que a substituição resulta em atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo quando a molécula de ligação a antígeno-modificada está em complexo com o antígeno-alvo.

[00024] Em outro aspecto, a presente invenção é ainda dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo um domínio CH1 compreendendo pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido quando comparado com o domínio CH1 de um

polipeptídeo precursor, em que a molécula de ligação a antígeno tem capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígeno-alvo como um resultado da substituição.

[00025] Em uma modalidade particular, a substituição no CH1 compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 148, 149 ou 150. Em uma modalidade mais específica, a substituição compreende uma substituição do resíduo de aminoácido na posição 149 por uma leucina. Em outra modalidade, a substituição compreende uma substituição do domínio CH1 inteiro. Em outra modalidade, a substituição compreende uma substituição de um domínio CH1 de IgG por um domínio CH1 de IgM.

[00026] Em outro aspecto, a invenção é dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido, em que a referida substituição compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na cadeia leve na região da interface entre as regiões variável e constante, em que a substituição resulta em atividade de sinalização celular alterada de uma molécula de ligação a antígeno-alvo quando a referida molécula de ligação a antígeno-modificada está em complexo com o referido antígeno-alvo.

[00027] Em outro aspecto, a invenção é dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo pelo menos um substituição de aminoácido, em que a referida substituição compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na cadeia leve na região da interface entre as regiões variável e constante, em que a referida molécula de ligação a antígeno-modificada tem capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígeno-alvo como um resultado da referida substituição.

[00028] Em uma modalidade particular, a substituição na região variável de cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um

aminoácido em uma ou mais das posições 10, 12, 39, 40, 41, 80, 81, 83, 84, 103, 105, 106, e 108 de Kabat. Em uma modalidade particular, a substituição na região variável de cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 40, 80, 83, 105 ou 106 de Kabat.

[00029] Em outra modalidade particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 40, 80, 83, 105 ou 106 de Kabat por um aminoácido não polar.

[00030] Em outra modalidade particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 40 de Kabat por uma alanina.

[00031] Em outra modalidade particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 80 de Kabat por uma prolina.

[00032] Em outra modalidade particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 83 de Kabat por uma fenilalanina.

[00033] Em outra modalidade particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 105 de Kabat por uma alanina.

[00034] Em outra modalidade particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 106 de Kabat por uma alanina. Em uma modalidade mais particular, a substituição na cadeia leve da ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 106 de Kabat, em que a molécula de ligação a antígeno tem capacidade reduzida de induzir à apoptose.

[00035] Em algumas modalidades as substituições da presente invenção compreendem uma combinação de quaisquer substituições

de resíduo de aminoácido nas regiões variável e/ou constante de cadeia pesada e/ou leve, conforme descrito aqui.

[00036] Em um aspecto, a(s) substituição(ões) na(s) ABMs modificadas da presente invenção resulta em uma atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo quando a ABM modificada está em complexo com o antígeno-alvo.

[00037] Em um aspecto da invenção, a atividade de sinalização celular alterada é atividade agonista aumentada. Em uma modalidade, a atividade agonista aumentada é selecionada do grupo consistindo em indução de apoptose e indução de diferenciação celular.

[00038] Em outro aspecto da invenção, a atividade de sinalização celular alterada é atividade antagonista aumentada. Em uma modalidade, a atividade antagonista é bloqueio de uma via de sinalização celular selecionada do grupo consistindo em sobrevivência celular, crescimento celular, proliferação celular e angiogênese.

[00039] Em um outro aspecto, a molécula de ligação a antígeno-modificada da presente invenção se liga especificamente ao CD20 humano. Em outro aspecto, a molécula de ligação a antígeno-modificada se liga especificamente a um membro da superfamília do receptor de TNF humano. Em uma modalidade particular, a superfamília do receptor de TNF humano é selecionada do grupo consistindo em TNFR1, CD95, TRAILR1, TRAILR2, EDAR e p75NGFR.

[00040] Em outro aspecto da invenção, a molécula de ligação a antígeno-modificada se liga especificamente a um receptor de tirosina quinase. Em uma modalidade particular, a quinase de tirosina de receptor é selecionada do grupo consistindo em HER1 (EGFR1), HER2/neu, HER3, HER4, IGF-1R, FGFR<sub>5</sub>, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Em uma modalidade mais específica, a quinase de tirosina de receptor é HER1 (EGFR1).

[00041] Em outro aspecto, a presente invenção, é ainda dirigida a uma ABM modificada que pode ser selecionada de, mas não está limitada a, o grupo consistindo em um anticorpo inteiro, um fragmento Fab, ou uma proteína de fusão dos mesmos, um fragmento F(ab')<sub>2</sub> ou uma proteína de fusão do mesmo, um minicorpo, um diacorpo, um triacorpo e um tetracorpo. Em uma modalidade particular, a ABM modificada é quimérica ou totalmente humana. Em uma modalidade mais particular, a ABM modificada quimérica é humanizada. Em outra modalidade particular, a ABM modificada é multiespecífica. Em uma modalidade mais particular, a ABM modificada é biespecífica.

[00042] Em outro aspecto, a molécula de ligação a antígeno precursora de acordo com a presente invenção compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 62.

[00043] Em outro aspecto, a molécula de ligação a antígeno precursora de acordo com a presente invenção compreende uma cadeia leve selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133 e SEQ ID NO: 134.

[00044] Em outro aspecto, a presente invenção é também dirigida a uma ABM modificada ainda compreendendo uma região Fc humana. De acordo com uma modalidade, a região Fc da ABM modificada foi modificada para ter oligossacarídeos alterados. Em uma modalidade mais específica, a região Fc foi modificada para ter uma proporção diminuída de resíduos de fucose comparado com uma região Fc não modificada. Em outra modalidade específica, a região Fc tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos bisseccionados comparado com uma região Fc não modificada. Em outra modalidade específica, os oligossacarídeos modificados são um complexo bisseccionado. Em

outra modalidade específica, os oligossacarídeos modificados tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos bisseccionados não fucosilados na região Fc comparado com uma região Fc não modificada. Em outra modalidade específica, a região Fc tem uma proporção aumentada de resíduos de GlcNAc para resíduo de fucose na região Fc modificada comparado com uma região Fc não modificada. Em outra modalidade específica, os oligossacarídeos bisseccionados não fucosilados não híbridos. Em outra modalidade específica os oligossacarídeos bisseccionados não fucosilados estão em complexo.

[00045] De acordo com outro aspecto, o antígeno-alvo de acordo com a presente invenção é um receptor na superfície celular selecionado do grupo consistindo em um receptor de transporte na membrana, um receptor proteína G-ligado e um receptor enzima-ligado. Em uma modalidade particular o receptor de transporte na membrana é um receptor canal-ligado. Em outra modalidade particular, o receptor enzima-ligado é selecionado do grupo consistindo em ciclasas de adenilato de receptor, quínases de tirosina de receptor, receptores quinase de tirosina-associados, fosfatases de tirosina de receptor e quínases de serina/treonina de receptor.

[00046] Em outro aspecto, a invenção é relacionada a uma composição farmacêutica compreendendo a ABM modificada da invenção. Considera-se que a composição farmacêutica pode ainda compreender um veículo, um adjuvante farmaceuticamente aceitável ou uma combinação dos mesmos.

[00047] A presente invenção é também dirigida a um método de tratamento de uma doença tratável por atividade de sinalização celular alterada em um paciente, o método compreendendo administração, ao paciente, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo a ABM modificada de

acordo com a invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00048] Em outro aspecto, a invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de *"framework"* quando comparado com uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve precursora e em que a substituição resulta em atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo quando o polipeptídeo está em complexo com o antígeno-alvo.

[00049] Em um outro aspecto, a invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de *"framework"* quando comparado com uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve precursora e em que o polipeptídeo tem capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígeno-alvo como um resultado da substituição.

[00050] Em uma modalidade, um polinucleotídeo de acordo com a presente invenção codifica um polipeptídeo, em que o polipeptídeo compreende uma cadeia pesada ou uma cadeia leve de anticorpo. Em uma modalidade, o polinucleotídeo de acordo com a presente invenção codifica um polipeptídeo, em que o polipeptídeo compreende uma proteína de fusão. A presente invenção é também dirigida a polipeptídeos codificados pelos polinucleotídeos da presente invenção.

[00051] A presente invenção é também dirigida a um vetor compreendendo um polinucleotídeo de acordo com a invenção e uma célula hospedeira compreendendo um vetor.

[00052] A invenção é ainda dirigida a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve a qual compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de "framework" da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve quando comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma molécula de ligação a antígeno precursora, em que o polipeptídeo é uma ABM modificada de acordo com a invenção.

[00053] A presente invenção é também dirigida a uma célula hospedeira manipulada para expressar pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglicosaminiltransferase III em uma quantidade suficiente para modificar os oligossacarídeos na região Fc de um polipeptídeo produzido pela célula hospedeira, em que o polipeptídeo é uma ABM modificada de acordo com a invenção. Em uma modalidade, o polipeptídeo tendo atividade de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglicosaminiltransferase III é um polipeptídeo de fusão. Em uma modalidade particular, o polipeptídeo de fusão compreende o domínio catalítico da  $\beta(1,4)$ -N-acetilglicosaminiltransferase III. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão ainda compreende o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi heterólogo. O domínio de localização no Golgi pode ser selecionado de, mas não está limitado a, o grupo consistindo do domínio de localização de manosidase I, do domínio de localização de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglicosaminiltransferase I, do domínio de localização de  $\beta(1,2)$ -N-acetilglicosaminiltransferase II, do domínio de localização de manosidase I e do domínio de localização de fucosiltransferase com núcleo de  $\alpha 1-6$ .

[00054] Em uma modalidade, a ABM modificada compreende uma região equivalente à região Fc da IgG humana.

[00055] Em uma outra modalidade, a ABM modificada produzida



pela célula hospedeira da presente invenção exibe afinidade de ligação ao receptor Fc aumentada e/ou função efetuada aumentada como um resultado da modificação de oligossacarídeos. De acordo com a presente invenção, a função efetuada aumentada é selecionada do grupo consistindo em citotoxicidade celular Fc-mediada aumentada, ligação aumentada à células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada à células polimorfonucleares, ligação aumentada a monócitos, sinalização direta para indução de apoptose aumentada, maturação aumentada de células dendríticas e iniciação aumentada de células T. Em uma modalidade, o receptor Fc é um receptor de ativação de Fc $\gamma$ . Em outra modalidade, o receptor Fc é um receptor Fc $\gamma$ RIIIA.

[00056] A célula hospedeira da presente invenção pode ser selecionada do grupo que inclui, mas não está limitado a, uma célula CHO, uma célula HEK293-EBNA, uma célula BHK, uma célula NSO, uma célula SP2/0, uma célula de mieloma YO, uma célula de mieloma de camundongo P3X63, uma célula PER, uma célula PER.C6 ou uma célula de hibridoma.

[00057] Em outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método para produção de uma ABM modificada compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreendendo pelo menos uma substituição de resíduos de aminoácido em pelo menos uma região de "*framework*" da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve quando comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma ABM precursora, em que a substituição resulta em atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo quando a ABM modificada está em complexo com o antígeno-alvo, o método compreendendo: (i) cultura da célula hospedeira da presente invenção sob condições que permitem a expressão do polinucleotídeo; e (ii) recuperação da ABM modificada

do meio de cultura.

[00058] Em um outro aspecto, a invenção é dirigida a um método para a produção de uma ABM modificada compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreendendo pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de *"framework"* da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve quando comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma molécula de ligação a antígeno precursora, em que a molécula de ligação a antígeno-modificada tem capacidade alterada de mediar a reticulação como um resultado da substituição, o método compreendendo: (i) cultura da célula hospedeira da presente invenção sob condições que permitem a expressão do polinucleotídeo; e (ii) recuperação da ABM modificada do meio de cultura.

[00059] Em um outro aspecto, a invenção é dirigida a um método de alteração da capacidade de uma ABM de facilitar a formação de complexos compreendendo o antígeno-alvo da ABM, o método compreendendo: substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de *"framework"* da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma ABM precursora. Em uma modalidade, a ABM aumenta a indução de apoptose em uma célula expressando o antígeno-alvo. Em outra modalidade, a invenção aumenta a indução de diferenciação celular em uma célula expressando o antígeno-alvo.

[00060] A presente invenção é também dirigida a um método de indução de apoptose em uma célula, o método compreendendo contato da célula com uma ABM modificada compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve a qual compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de *"framework"* da referida região de

região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve quando comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma ABM precursora, em que a ABM modificada tem capacidade aumentada de induzir à apoptose quando comparado com o polipeptídeo precursor. Em uma modalidade particular, a célula é uma célula tumorigênica. Em uma modalidade, o contato ocorre *in vivo*.

[00061] Em outro aspecto, a presente invenção é também dirigida a um método de tratamento de uma doença ou distúrbio que é tratável através de atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo, o método compreendendo administração, ao indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ABM modificada, em que a ABM modificada compreende uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em pelo menos uma região de "framework" da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma ABM precursora e em que a substituição resulta em atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo quando a ABM modificada está em complexo com o antígeno-alvo.

[00062] Em um outro aspecto, a invenção é dirigida a um método de tratamento de uma doença ou distúrbio que é tratável através da capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo, o método compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ABM modificada, em que a ABM modificada compreende uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em pelo menos uma região de "framework" da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve comparado com a região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve de uma ABM precursora e em que a ABM modificada tem

capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo como um resultado da substituição.

[00063] Em uma modalidade particular, a ABM modificada administrada de acordo com a presente invenção compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 36 e SEQ ID NO: 38.

[00064] Em um aspecto, a doença ou distúrbio a ser tratado com uma ABM modificada da presente invenção é um distúrbio de proliferação celular. Em uma modalidade, o distúrbio de proliferação celular é câncer. Em outro aspecto, a doença ou distúrbio a ser tratado com uma ABM modificada da presente invenção é um distúrbio de células B. Em uma modalidade específica, o distúrbio de células B é um linfoma de células B.

[00065] A presente invenção é também dirigida ao uso de uma ABM modificada de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de câncer.

[00066] Em uma modalidade particular, a presente invenção é também dirigida ao uso de uma ABM modificada de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de câncer, em que o referido câncer é selecionado do grupo consistindo em linfoma de células B, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de rim e câncer de cérebro.

[00067] Em outra modalidade particular, a presente invenção é também dirigida ao uso de uma ABM modificada de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de câncer, em que a referida molécula de ligação a antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 15 mg/kg. Em uma outra

modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. Em uma outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. Em uma outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é cerca de 1,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é cerca de 4,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz é cerca de 12 mg/kg.

[00068] A presente invenção é também dirigida a um método para o tratamento ou profilaxia de câncer compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica da invenção a um paciente que precisa da mesma. Em uma modalidade particular, o câncer é selecionado do grupo consistindo em linfoma de células B, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de rim e câncer de cérebro.

[00069] A presente invenção é também dirigida a um método para o tratamento ou profilaxia de uma condição ou lesão pré-cancerígena compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 85 ou 158 a um paciente que precisa da mesma. Em uma modalidade particular, a condição ou lesão pré-cancerígena é selecionada do grupo consistindo em leucoplasia oral, queratose actínica (queratose solar), pólipos pré-cancerígenos do cólon ou reto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de câncer de cólon de não-polipose hereditária (HNPCC), esôfago de Barrett, displasia de bexiga e condições cervicais pré-cancerígenas.

[00070] A presente invenção é também dirigida a uma molécula de

ligação a antígeno-modificada da presente invenção para uso no tratamento ou profilaxia de câncer. Em uma modalidade particular, o câncer é selecionado do grupo consistindo em linfoma de células B, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de rim e câncer de cérebro.

[00071] A presente invenção é também dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada da presente invenção para uso no tratamento ou profilaxia de uma condição ou lesão pré-cancerígena. Em uma modalidade particular, a condição ou lesão pré-cancerígena é selecionada do grupo consistindo em leucoplasia oral, queratose actínica (queratose solar), pólipos pré-cancerígenos do cólon ou reto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de câncer de cólon de não-polipose hereditária (HNPCC), esôfago de Barrett, displasia de bexiga e condições cervicais pré-cancerígenas.

[00072] A presente invenção é também dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada de acordo com a presente invenção para uso em terapia de um distúrbio que é relacionado à atividade de sinalização celular alterada e/ou reticulação alterada de um ou mais antígenos-alvo.

#### Breve Descrição das Figuras

[00073] Figura 1. Alinhamento de seqüência de aminoácido de várias estruturas de região variável de cadeia pesada de anticorpo anti-CD20. A seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal 1F5 é usada como a seqüência de referência. Diferenças em aminoácidos com relação ao 1F5 estão sombreadas.

[00074] Figura 2. Ligação de diferentes anticorpos anti-CD20 humanizados à células B de Raji. O B-ly1 precursor (quimérico) é

comparado com aquele de duas variantes de cadeia pesada humanizadas que foram identificados como induzindo à forte apoptose (BHH2 e BHH6), bem como aqueles derivados da variante B- HL8 (humanizada, não apoptótica) que se supunha restaurar esse efeito (B-HL11 a 17). Todas as variantes de cadeia pesada humanizada foram emparelhadas com a mesma variante de cadeia leve humanizada do BKV1.

[00075] Figura 3. Ligação de rituximab (O) e chB-ly1 ( $\Delta$ ) a CD20 sobre células de linfoma B de Raji

[00076] Figura 4. Comparação de apoptose anticorpo-dependente por três anticorpos anti-CD20. chB-ly1 wt representa uma estrutura de anticorpo B-ly1 quimérico tendo uma região variável de murino e uma região constante humana. BHH2-BKV1 representa uma variante humanizada compreendendo CDRs de B-ly1 de murino e regiões de "framework" humanas derivadas de genes de V de linhagem germinativa humana da classe VH1 para a cadeia pesada e emparelhadas com a cadeia leve de B-ly1 humanizado, BKV1. BHL8-BKV1 wt representa uma variante humanizada compreendendo CDRs de B-ly1 de murino e regiões de "framework" humanas derivadas de dois genes de V de linhagem germinativa humana com a cadeia leve de B-ly1 humanizado, BKV1.

[00077] Figura 5. Comparação de apoptose anticorpo-dependente por cinco variantes humanizadas do anticorpo anti-CD20 B-ly1. BHH2-BKV1 representa uma variante humanizada compreendendo CDRs de B-ly1 de murino e regiões de "framework" humanas derivadas da classe VH1 para a cadeia leve (BHH2) e emparelhadas com a cadeia leve de B-ly1 humanizada, BKV1. BHL8-BKV1 wt representa uma variante humanizada compreendendo CDRs de B-ly1 de murino e regiões de "framework" derivadas de dois genes V de linhagem germinativa humana diferentes e emparelhados com a cadeia leve do

B-ly1 humanizado, BKV1. BHL14-BKV1 representa um derivado de BHL8, com uma substituição de valina para lisina na posição 12 de Kabat e uma substituição de valina para metionina na posição 48 de Kabat da região variável de cadeia pesada e emparelhada com a estrutura de cadeia leve do BKV1. BHL15-BKV1 W1 é também derivado do BHL8, com uma substituição de glicina para serina na posição 16 de Kabat e uma substituição de valina para metionina na posição 48 de Kabat da região variável de cadeia pesada e emparelhada com a estrutura de cadeia leve do BKV1. BHL16-BKV1 W1 é derivado do BHL8, com uma substituição de leucina para valina na posição 20 de Kabat e uma substituição de valina para metionina na posição 48 de Kabat da região variável de cadeia pesada e emparelhada com a estrutura de cadeia leve do BKV1. BHL17-BKV1 W1 é derivado do BHL8, com uma substituição de valina para metionina na posição 48 de Kabat da região variável de cadeia pesada e emparelhada com a estrutura de cadeia leve do BKV1.

[00078] Figura 6. Comparação de apoptose anticorpo-dependente em células Z-138 pelo anticorpo monoclonal anti-CD20 C2B8 e duas variantes humanizadas de anticorpo B-ly1. BHH2-BKV1 e BHL13-BKV1. BHH2-BKV1 representa uma variante humanizada compreendendo CDRs de B-ly1 de murino e regiões de *"framework"* humanas derivadas de genes de V de linhagem germinativa humana da classe VH1 para a cadeia pesada e emparelhado com a cadeia leve de B-ly1 humanizado, BKV1. BHL13-BKV1 é derivado do BHL8 (vide figura 5 acima), com uma substituição de leucina por valina na posição 11 de Kabat e uma substituição de valina por metionina na posição 48 de Kabat na região variável de cadeia pesada e emparelhada com uma cadeia leve de BKV1.

[00079] Figura 7. Depleção de células- $\beta$  pelo rituximab (o) e chB-ly1 (■) em sangue íntegro das três diferentes classes de genotipo



FcγRIIIa-158V/F: (A) sangue íntegro de doador F/F, homozigótico para o receptor de menor afinidade; (B) sangue íntegro de doador F/V, heterozigótico para o receptor de afinidade; e (C) sangue íntegro de um doador V/V, homozigótico para o receptor de maior afinidade.

[00080] Figura 8. Perfil de MALDI-TOF de um anticorpo B-ly1 glico-manipulado, quimérico. (A) Tabela detalhando os percentuais de picos específicos; (B) Espectro para B-ly1 glico-manipulado B-ly1; (C) Espectro para B-ly1 glico-manipulado quimérico tratado com Endo-H.

[00081] Figura 9. Ligação de diferentes anticorpos anti-CD20 humanizados à células-β de Raji. As diferenças entre a estrutura B-HH2 e as estruturas B-HL8 e B-HL11 estão localizadas nas regiões de "framework" 1 e 2 com todas as três CDRs sendo idênticas. B-HL8 e B-HL11 têm suas seqüências FR1 e FR2 derivadas da classe VH3 humana, enquanto que a "framework" completa de B-HH2 é derivada de VH1 humana. B-HL11 é um derivado de B-HL8 com a única mutação Glu1Gln, com Gln sendo o resíduo de aminoácido na estrutura B-HH2. Isso significa que a troca Glu1Gln não altera a afinidade ou intensidade de ligação. As outras diferenças entre HH2 e B-HL8 são 14 resíduos FR, dos quais um ou mais influenciarão o comportamento de ligação a antígeno desse anticorpo.

[00082] Figura 10. Ligação de anticorpo anti-CD20 humanizado BHL4-BKV1 à células-alvo de Raji. A estrutura B-HL4 é derivada do anticorpo B-HH2 através de substituição da FR1 do B-HH2 por aquela da seqüência de linhagem germinativa humana IGHV1-45 (No. de Ac. X92209). Essa estrutura mostra capacidade de ligação a antígeno grandemente diminuída, a despeito de ter diferentes aminoácidos em quatro posições dentro da FR1. Esses resíduos estão localizados nas posições 2, 14, 28 e 30 de acordo com a numeração de Kabat. Desses, as posições 28 e 30 parecem ser posições de influência, uma vez que elas são parte da definição de CDR1 de Chothia.

[00083] Figura 11. Comparação do comportamento de ligação entre B-HH1 , B-HH2, B-HH3 (todos emparelhados com a cadeia leve de B-ly1 humanizada, BKV1) e o anticorpo precursor B-ly1. Os dados mostram que todos os Abs mostram um valor de EC<sub>50</sub> similar, mas a estrutura B-HH1 se liga com uma intensidade/estequiometria menor do que as variantes B-HH2 e B-HH3. B-HH1 pode ser distinguido de B-HH2 e B-HH3 por suas regiões de CDR1 e CDR2 parcialmente humanas (definição de Kabat), bem como o polimorfismo Ala/Thr na posição 28 (numeração de Kabat). Isso indica que a posição 28, a CDR1 completa e/ou a CDR2 completa é importante para a interação anticorpo/antígeno.

[00084] Figura 12. Comparação do comportamento de ligação entre B-HL1, B-HH1 e o anticorpo precursor B-ly1. Os dados mostraram a ausência de qualquer atividade de ligação na estrutura B-HL1 e cerca de metade da intensidade/estequiometria de ligação da B-HH1 comparado com B-ly1. B-HL1, bem como B-HH1, são projetadas baseado em "*framework*" aceitadoras derivadas da classe VH1 humana. Dentre outras diferenças, a posição 71 (numeração de Kabat) da estrutura B-HL1 é uma diferença que se destaca, indicando sua importância putativa para a ligação a antígeno.

[00085] Figura 13. Comparação do comportamento de ligação entre a estrutura de cadeia pesada do anticorpo anti-CD30 B-HL2 e B-HL3 a seu antígeno. Em ambos os casos, a sequência VL de murino foi combinada com as cadeias pesadas humanizadas. Os dados mostraram que as estruturas B-HL2 e B-HL3 não mostram atividade de ligação ao CD20.

[00086] Figura 14. Efeito apoptótico de anticorpos anti-CD20 sobre células Z-138 MCL.

[00087] Figura 15. Apoptose sobre anticorpos anti-CD20. Detalhes do ensaio: 5 x 10<sup>5</sup> células/cavidade foram cultivadas em lâminas com

24 cavidades ( $5 \times 10^5$  células/ml) em meio de cultura. Uma concentração final de 10 µg/ml do respectivo anticorpo, PBS para o controle negativo ou controle positivo de Camptotecina (CPT) a 5 mM, foram adicionados às cavidades. As amostras foram incubadas o/n (16 h), coradas com AnnV-FITC e analisadas através de FACS. Os ensaios foram realizados em triplicata. (\*): Sinal para PBS apenas subtraído (PBS sozinho proporcionou 8% e 2% de AnnV+ para células PR-1 e Z-138, respectivamente). Os anticorpos usados foram: C2B8 (quimérico, não glico-manipulado); BHH2-BKV1 (humanizado, não glico-manipulado). Nota: esse ensaio não envolve quaisquer células efetadoras adicionais, apenas alvos mais anticorpo ou controles.

[00088] Figura 16. Morte célula-objetivada de anticorpos anti-CD20 com células efetadoras imunes. Detalhes do ensaio: depleção de células-β em sangue íntegro normal foi determinada através de incubação durante a noite e análise com relação ao CD19+/CD3+ através de FACS. ADCC foi determinada usando PBMCs como efetadores com uma incubação de 4 h e uma proporção de efetador:alvo de 25:1. A morte alvo foi medida através de retenção de Calceína com relação à lise com detergente (100%) e à lise sem anticorpo (0%). Anticorpos usados foram: C2B8 (quimérico, forma não glico-manipulada); BHH2-BKV1-peso (humanizado, forma não glico-manipulada de BHH2-BKV1); BHH2-BKV1-GE (humanizado, forma glico-manipulada de BHH2-BKV1).

[00089] Figura 17. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligossacarídeos de Fc PNGaseF-liberados de anticorpo anti-CD20 humano B-ly1 de IgG1 humanizado BHH2-BKV1.

[00090] Figura 18. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligossacarídeos de Fc PNGaseF-liberados de anticorpo anti-CD20 humano B-ly1 de IgG1 humanizado BHH2-BKV1g1. Glico-manipulação foi realizada através de co-expressão, em células hospedeiras, de genes de anticorpo e um

gene que codifica uma enzima com atividade catalítica de  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) .

[00091] Figura 19. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligossacarídeos de Fc PNGaseF-liberados de anticorpo anti-CD20 humano B-ly1 de IgG1 humanizado BHH2-BKV1g2. Glico-manipulação foi realizada através de co-expressão, em células hospedeiras, de genes de anticorpo e genes que codificam uma atividade catalítica de  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) e codificam uma enzima com atividade catalítica de  $\alpha$ -manosidase II no Golgi.

[00092] Figura 20. Ligação de anticorpos não glico-manipulados e glico-manipulados (versão g2; vide Figuras 17-19 para perfis de glicosilação) ao receptor Fc $\gamma$ RIIIa humano mostrada sobre a superfície de células CHO expressando CD16 recombinante.

[00093] Figura 21. Efeito apoptótico de anticorpos anti-CD20 não-Fc-manipulados e Fc-manipulados sobre células de MCL Z-138. Detalhes do ensaio:  $5 \times 10^5$  células/cavidade foram cultivadas em lâminas com 24 cavidades ( $5 \times 10^5$  células/ml) em meio de cultura. Uma concentração final de 10  $\mu$ g/ml do respectivo anticorpo ou PBS para o controle negativo, foi adicionada às cavidades. As amostras foram incubadas o/n (16 h), coradas com AnnV-FITC e analisadas através de FACS. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os anticorpos usados foram: C2B8 = rituximab (quimérico, forma não-glico-manipulada); BHH2-BKV1 (humanizado, forma não-glico-manipulada, vide Figuras 17 - 19 para perfil de glicosilação); BHH2-BKV1g1 (humanizado, glico-manipulado); BHH2-BKV1g2 (humanizado, glico-manipulado). Nota: esse ensaio não envolve quaisquer células efetadoras adicionais, apenas alvos mais anticorpo ou controles. (\*): Sinal para PBS apenas foi subtraído.

[00094] Figura 22. Ligação de diferentes anticorpos anti-CD20 humanizados à células B de Raji. A estrutura de cadeia pesada

humanizada BHH2 é comparada com seus derivados BHH4 e BHH7. Também mostradas são variantes que se dirigem à influência das posições 28 e 30 de Kabat (BHH8 e BHH9).

[00095] Figura 23. Efeito de troca de um único aminoácido sobre a apoptose por anticorpos anti-CD20 sobre células de MCL Z-138. Detalhes do ensaio:  $5 \times 10^5$  células/cavidade foram cultivadas em lâminas com 24 cavidades ( $5 \times 10^5$  células/ml) em meio de cultura. Uma concentração final de 10 µg/ml do respectivo anticorpo ou PBS para o controle negativo (sem Ab), foi adicionada às cavidades. As amostras foram incubadas o/n (16 h), coradas com AnnV-FITC e analisadas através de FACS. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os anticorpos usados foram: C2B8 = rituximab (quimérico, forma não-glico-manipulada); BHH2-BKV1 (humanizado, forma não-glico-manipulada); BHH2 (humanizado, não-glico-manipulado), BHH2-A (um derivado de BHH2 com uma substituição de valina por leucina na posição 11 de Kabat) e BHH2-B (um derivado de BHH2 com uma substituição de lisina por valina na posição 12 de Kabat), os dois últimos emparelhados com uma cadeia leve de BKV1. A  $K_D$  da ligação a antígeno permanece inalterada pela substituição. Nota: esse ensaio não envolve quaisquer células efetadoras adicionais, apenas alvos mais anticorpo ou controles.

[00096] Figura 24. Efeito de troca de um único aminoácido sobre a apoptose por anticorpos anti-CD20 anteriormente inativos sobre células de MCL Z-138. Detalhes do ensaio:  $5 \times 10^5$  células/cavidade foram cultivadas em lâminas com 24 cavidades ( $5 \times 10^5$  células/ml) em meio de cultura. Uma concentração final de 10 µg/ml do respectivo anticorpo ou PBS para o controle negativo, foi adicionada às cavidades. As amostras foram incubadas o/n (16 h), coradas com AnnV-FITC e analisadas através de FACS. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os anticorpos usados foram: C2B8 = rituximab

(quimérico, forma não-glico-manipulada); BHL8 (humanizado, não-glico-manipulado), BHL13 (um derivado de BHL8 com uma substituição de leucina por valina na posição 11 de Kabat e uma substituição de valina por metionina na posição 48 de Kabat) e BHL14 (um derivado de BHL8 com uma substituição de valina por lisina na posição 12 de Kabat e uma substituição de valina por metionina na posição 48 de Kabat), os três últimos emparelhados com uma cadeia leve de BKV1. Nota: esse ensaio não envolve quaisquer células efetadoras adicionais, apenas alvos mais anticorpo ou controles.

[00097] Figura 25. Efeito de troca de um único aminoácido dentro da cadeia leve sobre a apoptose por anticorpos anti-CD20 sobre células de MCL Z-138. Detalhes do ensaio:  $5 \times 10^5$  células/cavidade foram cultivadas em lâminas com 24 cavidades ( $5 \times 10^5$  células/ml) em meio de cultura. Uma concentração final de 10  $\mu$ g/ml do respectivo anticorpo ou PBS para o controle negativo, foi adicionada às cavidades. As amostras foram incubadas o/n (16 h), coradas com AnnV-FITC e analisadas através de FACS. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os anticorpos usados foram BHH2-A (um derivado de BHH2 com uma substituição de valina por leucina na posição 11 de Kabat) emparelhado com uma cadeia leve de BKV1, BHH6 (um derivado de BHH2 com uma substituição de metionina por isoleucina na posição 34 de Kabat) emparelhado com uma cadeia leve de BKV1 e BHH6 emparelhado com uma cadeia leve de BKV14 (um derivado de BKV1 com uma substituição de isoleucina por alanina na posição 106 de Kabat).

[00098] Figura 26. Representação tridimensional de uma “união em esfera-e-soquete” na interface entre os domínios VH e CH1.

#### Descrição Detalhada da Invenção

[00099] Os termos são usados aqui conforme geralmente usado na técnica, menos que de outro modo definido como segue e aqui.

[000100] Conforme usado aqui, o termo *molécula de ligação a antígeno* (ABM) se refere, em seu sentido mais amplo, a uma molécula que se liga especificamente a um determinante antigênico. Por “se liga especificamente” entenda-se que a ligação é seletiva para o antígeno e pode ser discriminada de interações indesejadas ou não específicas. Conforme usado aqui, o termo *molécula de ligação a antígeno-modificada* (ou *ABM modificada*) se destina a se referir a uma ABM compreendendo pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido na região variável de cadeia pesada e/ou região CH1 e/ou pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido na região variável de cadeia leve e/ou região CL.

[000101] Conforme usado aqui, o termo *anticorpo* se destina a incluir moléculas de anticorpo inteiro, incluindo anticorpos monoclonais, policlonais e multi-específicos (por exemplo, bi-específicos), bem como fragmentos de anticorpo tendo a região Fc e retendo a especificidade de ligação e proteínas de fusão que incluem uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina e que retêm a especificidade de ligação. Também abrangidos são fragmentos de anticorpo que retêm a especificidade de ligação incluindo, mas não limitado a, fragmentos V<sub>H</sub>, fragmentos V<sub>L</sub>, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicorpos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos (vide, por exemplo, Hudson e Souriau, *Nature Med.* 9: 129-134 (2003), incorporado aqui por referência em sua totalidade). Também abrangidos são anticorpos humanizados, primatizados e quiméricos. Conforme usado aqui, *anticorpo inteiro* se refere a uma molécula de imunoglobulina compreendendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, cada uma das quais compreende uma região variável e constante.

[000102] Conforme usado aqui, o termo *região variável* se destina a se referir ao domínio N-terminal de uma cadeia pesada ou leve de

imunoglobulina. De acordo com uma modalidade da presente invenção, uma ABM modificada pode compreender um fragmento funcional de uma região variável.

[000103] Conforme usado aqui, o termo *região variável de cadeia pesada* se destina a se referir ao domínio N-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Em um exemplo, a região variável de cadeia pesada é definida pelas posições 1 a 113 de Kabat (com possíveis inserções em resíduos particulares, conforme designado por Kabat e outros, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)). De acordo com uma modalidade da presente invenção, uma ABM modificada pode compreender um fragmento funcional de uma região variável de cadeia pesada.

[000104] Conforme usado aqui, o termo *região variável de cadeia pesada* se destina a se referir ao domínio C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Existem cinco classes que ocorrem naturalmente de regiões variáveis de cadeia pesada: IgA, IgG, IgE, IgD e IgM. Em um exemplo, a região variável de cadeia pesada compreende um domínio CH1, um domínio CH2 e um domínio CH3.

[000105] Conforme usado aqui, o termo *região CH1* se destina a se referir ao domínio da cadeia pesada de uma imunoglobulina que é exatamente C-terminal à região variável e N-terminal à região de dobradiça. Em uma imunoglobulina do tipo IgG, por exemplo, CH1 é normalmente definido pelas posições 114 a 228 de Kabat.

[000106] Conforme usado aqui, o termo *apoptose* se destina a se referir à morte celular programada, a qual é caracterizada por determinados eventos celulares, tais como fragmentação nuclear e/ou formação de corpos apoptóticos através de condensação do citoplasma, membranas plasmáticas e/ou organelas.

[000107] Conforme usado aqui, o termo *atividade agonista* se destina



a se referir à atividade de uma agente (por exemplo, uma molécula de ligação a antígeno) quando ele interage com (por exemplo, se liga a) uma molécula associada com uma superfície celular e inicia ou induz a uma reação.

[000108] Conforme usado aqui, o termo *atividade antagonista* se destina a se referir à atividade de uma agente (por exemplo, uma molécula de ligação a antígeno) quando ele interage com (por exemplo, se liga a uma molécula sobre uma célula e impede o início ou indução de uma reação ou descontinua uma reação em andamento.

[000109] Conforme usado aqui, os termos  *fusão* e *quimérico*, quando usados em referência a polipeptídeos, tais como ABMs, se referem a polipeptídeos compreendendo seqüências de aminoácido derivadas de dois ou mais polipeptídeos heterólogos, tais como porções de anticorpos de diferentes espécies. Para ABMs quiméricas, por exemplo, os componentes de não – ligação a antígeno podem ser derivados de uma ampla variedade de espécies, incluindo primatas, tais como chimpanzés e seres humanos. A região constante da ABM quimérica é, mais preferivelmente, substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo quimérico é, mais preferivelmente, derivada de uma molécula de ligação a antígeno não-humana (isto é, doadora) que se liga especificamente a um antígeno de interesse. A ABM quimérica pode compreender a região variável inteira do doador; alternativamente, o anticorpo quimérico pode compreender um anticorpo humanizado ou primatizado. Anticorpos humanizados são uma forma particularmente preferida de anticorpo de fusão ou quimérico.

[000110] Conforme usado aqui, o termo *humanizado* é usado para se referir a uma molécula de ligação a antígeno derivada de uma

molécula de ligação a antígeno não-humana, por exemplo, um anticorpo de murino, que retêm ou retêm substancialmente as propriedades de ligação a antígeno da molécula precursora, mas o qual é menos imunogênico em seres humanos. Isso pode ser obtido através de vários métodos, incluindo (a) enxertagem dos domínios variáveis não-humanos sobre regiões constantes humanas para gerar anticorpos quiméricos, (b) enxertagem apenas das CDRs não-humanas sobre as regiões de "framework" e constante humanas (por exemplo, aquelas que são de importância para retenção de boa afinidade de ligação a antígeno ou funções do anticorpo) ou (c) transplante dos domínios variáveis não-humanos inteiros, mas "ocultando" os mesmos com uma seção semelhante à humana através de substituição de resíduos na superfície. Tais métodos são descritos em Jones e outros, Morrison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855 (1984); Morrison e Oi, *Adv. Immunol*, 44: 65-92 (1988); Verhoeyen e outros, *Science*, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994), todos os quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade .

[000111] Geralmente, existem 3 regiões de determinação de complementaridade ou CDRs (CDR1, CDR2 e CDR3) em cada um dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo, as quais são flanqueadas por quatro sub-regiões de "framework" (isto é, FR1, FR2, FR3 e FR4) em cada um dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Uma discussão de anticorpos humanizados pode ser encontrada *inter alia*, na Patente U.S. No. No. 6.632.927 e no Pedido U.S. publicado No. 2003/0175269, ambos os quais são incorporados por referência em sua totalidade aqui.

[000112] Similarmente, conforme usado aqui, o termo *primatizado* é

usado para se referir a uma molécula de ligação a antígeno derivada de uma molécula de ligação a antígeno de não-primata, por exemplo, um anticorpo de murino, que retêm ou retêm substancialmente as propriedades de ligação a antígeno da molécula precursora, mas o qual é menos imunogênica em primatas.

[000113] No caso onde existem duas ou mais definições de um termo as quais são usadas e/ou aceitas dentro da técnica, a definição do termo conforme usado aqui se destina a incluir todos de tais significados, a menos que explicitamente estabelecido o contrário. Um exemplo específico é o uso do termo “região de determinação de complementaridade” (“CDR”) para descrever o antígeno não contínuo combinando sítios encontrados dentro da região variável de polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Essa região em particular foi descrita por Kabat e outros, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) e por Chothia e outros, *J Mol Biol.* 196: 901-917 (1987), os quais são incorporados aqui por referência, onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácido quando comparados uns contra os outros. Todavia, a aplicação da definição para se referir a uma CDR de um anticorpo ou variantes do mesmo se destina a estar dentro do escopo do termo, conforme definido e usado aqui. Os resíduos de aminoácido apropriados os quais abrangem as CDRs, conforme definido por cada uma das referências citadas acima, são apresentados abaixo na Tabela I como uma comparação. Os número exatos dos resíduos os quais abrangem uma CDR em particular variarão, dependendo da seqüência e do tamanho da CDR. Aqueles habilitados na técnica podem determinar rotineiramente quais resíduos compreendem uma CDR em particular dada a seqüência de aminoácido da região variável do anticorpo.

TABELA I. Definições de CDR<sup>1</sup>

	Kabat	Chothia	OxAbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-34
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup>Numeração de todas as definições de CDR na Tabela 1 de acordo com as conversões de numeração apresentadas por Kabat e outros (vide abaixo).

<sup>2</sup>“OxAbM” se refere às CDRs conforme definido pelo software de modificação de anticorpo “AbM” da Oxford Molecular

[000114] Kabat e outros também definiram um sistema de numeração também definiram um sistema de numeração para seqüências de domínio variável que é aplicável a qualquer anticorpo. Aqueles versados na técnica podem, inequivocadamente, atribuir esse sistema de “numeração de Kabat” a qualquer seqüência de domínio variável, sem contar com quaisquer dados experimentais além da seqüência em si. Conforme usado aqui, “numeração de Kabat” se refere ao sistema de numeração apresentado por Kabat e outros, U.S. Dept. of Health e Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983). A menos que de outro modo especificado, referências à numeração de posições de resíduo de aminoácido específicas em uma ABM são de acordo com o sistema de numeração de Kabat. As seqüência da listagem de seqüência não são numeradas de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

[000115] Conforme usado aqui, *um polipeptídeo tendo “atividade de GnTIII”* se refere a polipeptídeos que são capazes de catalisar a adição de um resíduo de N-acetilglicosamina (GlcNAc) em uma

ligação  $\beta$ -1-4 ao manosídeo  $\beta$ -ligado do núcleo de trimanosila de oligossacarídeos N-ligados. Isso inclui polipeptídeos de fusão exibindo atividade enzimática similar a, mas não necessariamente idêntica a, uma atividade de  $\beta$ (1,4)-N-acetilglicosaminiltransferase III, também conhecida como 4-beta-N-acetilglicosaminil-transferase de  $\beta$ -1,4-manosil-glicoproteína (EC 2.4.1.144), de acordo com o Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), conforme medido em um ensaio biológico em particular, com ou sem dependência de dose. No caso onde dependência de dose existe, ela não precisa ser idêntica àquela da GnTIII, mas antes, substancialmente similar à dose-dependência em uma determinada atividade quando comparado com a GnTIII (isto é, o polipeptídeo candidato exibirá maior atividade ou não mais do que cerca de 25 vezes menos e, de preferência, não mais do que cerca de 10 vezes menos atividade e, ainda mais preferivelmente, não mais do que cerca de 3 vezes menos atividade com relação à GnTIII).

[000116] Conforme usado aqui, o termo *variante* (ou *análogo*) se refere a um polipeptídeo diferindo de um polipeptídeo especificamente mencionado da invenção por inserções, deleções, e substituições de aminoácido criadas usando, por exemplo, técnicas de DNA recombinante. Variantes das ABMs da presente invenção incluem moléculas de ligação a antígeno quiméricas, primatizadas ou humanizadas, em que um ou vários dos resíduos de aminoácido são modificados através de substituição, adição e/ou deleção, de uma forma tal que não afeta substancialmente a afinidade de ligação a antígeno. Orientação para determinação de quais resíduos de aminoácido podem ser substituídos, adicionados ou deletados sem eliminar atividades de interesse, pode ser encontrada através de comparação da seqüência do polipeptídeo em particular com aquela de peptídeos homólogos e minimizando o número de alterações da

seqüência de aminoácido em regiões de alta homologia (regiões conservadas) ou através de substituição de aminoácidos por uma seqüência de consenso.

[000117] Alternativamente, variantes recombinantes que codificam esses mesmos ou polipeptídeos similares podem ser sintetizadas ou selecionadas fazendo uso da “redundância” no código genético. Várias substituições de códon, tais como as alterações silenciosas as quais produzem vários sítios de restrição, podem ser introduzidas para otimizar a clonagem em um plasmídeo ou vetor viral ou a expressão em um sistema procariota ou eucariota em particular. Mutações na seqüência de polinucleotídeo podem ser refletidas no polipeptídeo ou domínios de outros peptídeos adicionados ao polipeptídeo para modificar as propriedades de qualquer parte do polipeptídeo, alterar características tais como afinidades de ligação a ligante, afinidades intercadeia ou taxa de degradação/reconstrução.

[000118] Conforme usado aqui, *substituição de resíduo de aminoácido* se destina a se referir à substituição de um ou mais aminoácidos em uma seqüência de referência (por exemplo, uma molécula precursora, tal como uma molécula de ligação a antígeno). Em uma modalidade, substituição de resíduo de aminoácido pode ser obtida, por exemplo, através de uma mutação de ponto na seqüência de um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo quando comparado com uma seqüência precursora. Em outra modalidade, substituição de um resíduo de aminoácido pode ser obtida através de substituição da região de “*framework*” inteira do polipeptídeo precursor, por exemplo, por uma região de “*framework*” de uma seqüência VH de linhagem germinativa que compreende o aminoácido desejado na posição a ser substituída em referência ao precursor.

[000119] Substituições de aminoácido “conservativas” são aquelas feitas substituindo um aminoácido por outro aminoácido tendo

propriedades estruturais e/ou químicas similares, isto é, substituições conservativas de aminoácido e podem ser feitas com base na similaridade na polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou a natureza anfifática dos resíduos envolvidos. Por exemplo, aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; aminoácidos neutros polares incluem serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem arginina, lisina e histidina; e aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. “inserções” ou “deleções” estão, de preferência, na faixa de cerca de 1 a 20 aminoácidos, mais preferivelmente 1 a 10 aminoácidos. A variação permitida pode ser experimentalmente determinada fazendo sistematicamente inserções, deleções ou substituições de aminoácidos em uma molécula de polipeptídeo usando técnicas de DNA recombinante e avaliando as variantes recombinantes resultantes com relação à atividade.

[000120] Conforme usado aqui, o termo *molécula de ligação a antígeno precursora* ou *molécula precursora* se refere a um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido em particular codificada por uma seqüência de polinucleotídeo. A seqüência da molécula precursora (isto é, a *seqüência precursora*) serve como uma seqüência de referência para fazer substituições de resíduo de aminoácido que alteram a capacidade da molécula resultante (por exemplo, uma molécula de ligação a antígeno-modificada) de induzir ou bloquear a atividade de sinalização celular e/ou reticulação de antígeno. Da mesma forma, a atividade de uma molécula precursora serve como a referência quando de determinação se uma substituição tem um efeito sobre a via de sinalização celular e/ou reticulação de antígeno e, onde relevante a extensão desse efeito. Uma seqüência

contendo uma ou mais substituições de aminoácido em comparação com o seu precursor (por exemplo, uma ABM modificada) pode, por sua vez, servir como uma seqüência precursora para outras substituições.

[000121] Conforme usado aqui, o termo *atividade de sinalização celular alterada* se destina a se referir um aumento ou diminuição na capacidade de uma ABM de induzir ou inibir a atividade de sinalização celular de um antígeno-alvo.

[000122] Conforme usado aqui, o termo *reticulação alterada de um ou mais antígenos-alvo* se destina a se referir a um aumento ou diminuição na capacidade de uma ABM de se manter em proximidade íntima umas com as outras e/ou em proximidade íntima com outras moléculas membrana-associadas e/ou em uma conformação mais favorável para interação de antígenos-alvo que são capazes de formação de complexos (por exemplo, através de reticulação de proteínas ou oligomerização de receptores membrana-associados) para iniciar as vias de sinalização celular.

[000123] Conforme usado aqui, *mecanismo de sinalização celular* ou *atividade de sinalização celular* se destina a se referir à via de sinalização inteira (isto é, transdução de sinal) que leva a um evento celular ou função biológica em particular, bem como quaisquer etapas de sinalização ao longo da via.

[000124] Por um ácido nucléico ou polinucleotídeo tendo uma seqüência de nucleotídeo pelo menos, por exemplo, 95% “idêntica” a uma seqüência de nucleotídeo de referência da presente invenção, entenda-se que a seqüência de nucleotídeo do polinucleotídeo é idêntica à seqüência de referência, exceto que a seqüência de polinucleotídeo pode incluir até cinco mutações de ponto por cada 100 nucleotídeos da seqüência de nucleotídeo de referência. Em outras palavras, para obter um polinucleotídeo tendo uma seqüência de



nucleotídeo pelo menos 95% idêntica a uma seqüência de nucleotídeo de referência, até 5% dos nucleotídeos na seqüência de referência podem deletados ou substituídos por outros nucleotídeos ou um número de nucleotídeos até 5% dos nucleotídeos totais na seqüência de referência pode ser inserido na seqüência de referência.

[000125] Como um assunto prático, se qualquer molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo em particular é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma seqüência de nucleotídeo ou seqüência de polipeptídeo da presente invenção, pode ser determinado convencionalmente usando programas de computador conhecidos. Um método preferido para determinação da melhor combinação global entre uma seqüência de *query* (uma seqüência da presente invenção) e uma seqüência em questão, também referido como um alinhamento de seqüência global, pode ser determinado usando o programa de computador FASTDB baseado no algoritmo de Brutlag e outros, *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). Em um alinhamento de seqüência, as seqüências de *query* e em questão são ambas seqüências de DNA. Uma seqüência de RNA pode ser comparada convertendo U's em T's. O resultado do referido alinhamento de seqüência global é a identidade percentual. Parâmetros preferidos usados em um alinhamento FASTDB de seqüências de DNA para calcular a identidade percentual são: Matriz = Unitária, k-tuple = 4, Penalidade por Combinação Errônea = 1, Penalidade por União = 30, Extensão do Grupo de Randomização = 0, Escore de Corte = 1, Penalidade por GAP = 5, Penalidade por Tamanho de Gap 0,05, Tamanho de Janela = 500 ou o comprimento da seqüência de nucleotídeo em questão, o que for menor.

[000126] Se a seqüência em questão é mais curta do que a seqüência de *query* em virtude de deleções 5' ou 3', não em virtude de deleções internas, uma correção manual deve ser feita nos resultados.

Isso é porque o programa FASTDB não leva em conta truncamentos 5' e 3' da seqüência em questão quando de cálculo da identidade percentual. Para seqüências em questão truncadas nas extremidades 5' ou 3', com relação à seqüência de *query*, a identidade percentual é corrigida calculando-se o número de bases da seqüência de *query* que são 5' e 3' da seqüência em questão, as quais não são combinadas/alinhadas, como um percentual das bases totais da seqüência de *query*. Se um nucleotídeo é combinado/alinhado é determinado pelos resultados do alinhamento de seqüência FASTDB. Esse percentual é, então, subtraído da identidade percentual, calculada através do programa FASTDB acima usando os parâmetros específicos, para chegar a um escore final de identidade percentual. Esse escore corrigido é aquele que é usado para fins da presente invenção. Apenas bases fora das bases 5' e 3' da seqüência em questão, conforme visualizado pelo alinhamento FASTDB, as quais não são combinadas/alinhadas com a seqüência de *query*, são calculadas para fins de ajuste manual do escore de identidade percentual.

[000127] Por exemplo, uma seqüência em questão com 90 bases é alinhada a uma seqüência de *query* com 100 bases para determinar a identidade percentual. As deleções ocorrem na extremidade 5' da seqüência em questão e, portanto, o alinhamento FASTDB não mostra uma combinação/alinhamento das primeiras 10 bases na extremidade 5'. As 10 bases não emparelhadas representam 10% da seqüência (números de bases nas extremidades 5' e 3' não combinadas/ número total de bases na seqüência de *query*, de modo que 10% são subtraídos do escore de identidade percentual calculado pelo programa FASTDB. Se as 90 bases restantes foram perfeitamente combinadas, a identidade percentual final seria de 90%. Em outro exemplo, uma seqüência em questão com 90 bases é comparada com

uma seqüência de *query* com 100 bases. Nesse caso, as deleções são deleções internas, de modo que não existem bases sobre a extremidade 5' ou 3' da seqüência em questão, as quais não são combinadas/alinhadas com a *query*. Nesse caso, a identidade percentual calculada pelo FASTDB não é manualmente corrigida. Mais uma vez, apenas bases sobre a extremidade 5' e 3' da seqüência em questão as quais não são combinadas/alinhadas com a seqüência de *query* são manualmente corrigidas. Nenhuma outra correção manual é feita para fins da presente invenção.

[000128] Por um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos, por exemplo, 95% “idêntica” a uma seqüência de aminoácido de *query* da presente invenção, entenda-se que a seqüência de aminoácido do polipeptídeo em questão é idêntica à seqüência de *query*, exceto que a seqüência de polipeptídeo em questão pode incluir até cinco alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos da seqüência de aminoácido de *query*. Em outras palavras, para obter um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 95% idêntica a uma seqüência de aminoácido de *query*, até 5% dos resíduos de aminoácido na seqüência em questão podem ser inseridos, deletados ou substituídos por outro aminoácido. Essas alterações da seqüência de referência podem ocorrer nas posições amino ou carbóxi terminais da seqüência de aminoácido de referência ou em qualquer lugar entre essas posições terminais, interespaçadas individualmente entre os resíduos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contínuos dentro da seqüência de referência.

[000129] Como um assunto prático, se qualquer polipeptídeo em particular é pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico a um polipeptídeo de referência pode ser determinado convencionalmente usando programas de computador conhecidos.

Um método preferido para determinação da melhor combinação global entre uma seqüência de *query* (uma seqüência da presente invenção) e uma seqüência em questão, também referido como um alinhamento de seqüência global, pode ser determinado usando o programa de computador FASTDB baseado no algoritmo de Brutlag e outros, *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). Em um alinhamento de seqüência, as seqüências de *query* e em questão são ambas seqüências de nucleotídeo ou ambas seqüências de aminoácido. O resultado do referido alinhamento de seqüência global é a identidade percentual. Parâmetros preferidos usados em um alinhamento de aminoácido pelo FASTDB são: Matriz = PAM, k-tuple = 2, Penalidade por Combinação Errônea = 1, Penalidade por União = 20, Extensão do Grupo de Randomização = 0, Escore de Corte = 1, Penalidade por GAP = 5, Penalidade por Tamanho de Gap 0,05, Tamanho de Janela = 500 ou o comprimento da seqüência de nucleotídeo em questão, o que for menor.

[000130] Se a seqüência em questão é mais curta do que a seqüência de *query* em virtude de deleções N- ou C-terminais, não em virtude de deleções internas, uma correção manual deve ser feita nos resultados. Isso é porque o programa FASTDB não leva em conta truncamentos N- e C-terminais da seqüência em questão quando de cálculo da identidade percentual. Para seqüências em questão truncadas nos N- e C-términos, com relação à seqüência de *query*, a identidade percentual é corrigida calculando-se o número de número de resíduos da seqüência de *query* que são N- e C-terminais da seqüência em questão, as quais não são combinados/alinhados com o resíduo em questão correspondente como um percentual das bases totais da seqüência de *query*. Se um resíduo é combinado/alinhado é determinado pelos resultados do alinhamento de seqüência FASTDB. Esse percentual é, então, subtraído da identidade percentual,

calculado através do programa FASTDB acima usando os parâmetros especificados, para chegar a um escore final de identidade percentual. Esse escore corrigido é aquele que é usado para fins da presente invenção. Apenas resíduos nos N- e C-términos da seqüência em questão, os quais não são combinados/alinhados com a seqüência de *query*, são considerados para fins de ajuste manual do escore de identidade percentual. Isto é, apenas posições do resíduo de *query* fora dos resíduos N- e C-terminais mais distantes da seqüência em questão.

[000131] Por exemplo, uma seqüência em questão com 90 resíduos de aminoácido é alinhada com uma seqüência de *query* com 100 resíduos para determinar a identidade percentual. A deleção ocorre no N-término da seqüência em questão e, portanto, o alinhamento FASTDB não mostra uma combinação/alinhamento dos primeiros 10 resíduos no N-término. Os 10 resíduos não emparelhados (número de resíduos nos N- e C-términos não combinados/ número total de resíduos na seqüência de *query*), de modo que 10% são subtraídos do escore de identidade percentual calculado pelo programa FASTDB. Se os 90 resíduos restantes foram perfeitamente combinados, a identidade percentual final seria de 90%. Em outro exemplo, uma seqüência em questão com 90 resíduos é comparada com uma seqüência de *query* com 100 resíduos. Nesse caso, as deleções são deleções internas, de modo que não existem resíduos nos N- ou C-términos da seqüência em questão, os quais não são combinados/alinhados com a *query*. Nesse caso, a identidade percentual calculada pelo FASTDB não é manualmente corrigida. Mais uma vez, apenas resíduos nas posições fora das extremidades N- e C-terminais da seqüência em questão, conforme visualizado no alinhamento FASTDB, os quais não são combinados/alinhados com a seqüência de *query* são manualmente corrigidos. Nenhuma outra

correção manual tem de ser feita para fins da presente invenção.

[000132] Conforme usado aqui, um ácido nucléico que “*hibridiza sob condições estridentes*” a uma seqüência de ácido nucléico da invenção se refere a um polinucleotídeo que se hibridiza em uma incubação durante a noite a 42 °C em uma solução compreendendo formamida a 50%, 5x SSC (NaCl a 750 mM, citrato de sódio a 75 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 7,6), 5x solução de Denhardt, sulfato de dextrana a 10% e 20 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, seguido por lavagem dos filtros em 0,1x SSC a cerca de 65 °C.

[000133] Conforme usado aqui, o termo *região Fc* se destina a se referir a uma região C-terminal de uma cadeia pesada de IgG. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de IgG possam variar ligeiramente, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana usualmente é definida como se estendendo do resíduo de aminoácido na posição Cys226 ao carbóxi término.

[000134] Conforme usado aqui, o termo *região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina* se destina a incluir variantes alélicas que ocorrem naturalmente da região Fc com uma imunoglobulina, bem como variantes tendo alterações as quais produzem substituições, adições ou deleções, mas as quais não diminuem substancialmente a capacidade da imunoglobulina de mediar funções efetadoras (tal como citotoxicidade celular anticorpo-dependente). Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser deletados do N-término ou C-término da região Fc de uma imunoglobulina sem perda substancial de função biológica. Tais variantes podem ser selecionadas de acordo com normas gerais conhecidas na técnica, de modo a ter efeito mínimo sobre a atividade. (Vide, por exemplo, Bowie, J. U. e outros, *Science* 247: 1306-10 (1990)). Em uma modalidade, *uma região equivalente à região Fc* pode também formar parte de uma proteína de fusão

heteróloga. Em algumas modalidades, *uma região equivalente à região Fc* também abrange uma região correspondente de outra classe de cadeia pesada de imunoglobulina (por exemplo, IgA, IgE, IgD e IgM).

[000135] Conforme usado aqui, o termo *domínio de localização no Golgi* se refere à seqüência de aminoácido de um polipeptídeo residente no Golgi o qual é responsável por ancoragem do polipeptídeo na localização dentro do complexo de Golgi. Geralmente, domínios de localização compreendem “caudas” amino terminais de uma enzima.

[000136] Conforme usado aqui, o termo *função efetuidora* se refere àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de uma seqüência nativa ou região Fc variante de seqüência de aminoácido) de um anticorpo. Exemplos de funções efetuidoras de anticorpo incluem, mas não estão limitadas a, afinidade de ligação ao receptor Fc, citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), fagocitose celular anticorpo-dependente (ADCP), secreção de citocina, captação de antígeno complexo imune–mediada por célula apresentando antígeno, sub-regulação de receptores na superfície celular, etc.

[000137] Conforme usado aqui, os termos *manipular, manipulado, manipulação, glico-manipular, glico-manipulado, glico-manipulação e manipulação de glicosilação* são considerados como incluindo qualquer manipulação do padrão de glicosilação de um polipeptídeo que ocorre naturalmente ou recombinante, tal como uma molécula de ligação a antígeno (ABM) ou fragmento da mesma. Manipulação de glicosilação inclui manipulação metabólica da maquinaria de glicosilação de uma célula, incluindo manipulações genéticas das vias de síntese de oligossacarídeos para obter glicosilação alterada de glicoproteínas expressas em célula. Em uma modalidade, a

manipulação de glicosilação é uma alteração na atividade de glicosiltransferase. Em uma modalidade particular, a manipulação resulta em atividade de glicosaminiltransferase e/ou atividade de fucosiltransferase alterada.

[000138] Conforme usado aqui, o termo *célula hospedeira* cobre qualquer tipo de sistema celular o qual pode ser manipulado para gerar os polipeptídeos e moléculas de ligação a antígeno da presente invenção. Células hospedeiras incluem células cultivadas, por exemplo, células cultivadas de mamífero, tais como células CHO, células BHK, células HEK293-EBNA, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 e células de hibridoma, células de levedo, células de inseto e células de planta, para mencionar umas poucas mas também células compreendendo dentro de um animal transgênico, planta transgênica ou planta cultivada ou tecido animal. Em uma modalidade, a célula hospedeira é manipulada para permitir a produção de uma molécula de ligação a antígeno com glicoformas modificadas. Em uma modalidade preferida, a molécula de ligação a antígeno é um anticorpo, fragmento de anticorpo ou proteína de fusão. Em determinadas modalidades, a célula hospedeira foi ainda manipulada para expressar níveis aumentados de um ou mais polipeptídeos tendo atividade de GnTIII. Em outras modalidades, as células hospedeiras foram manipuladas para ter atividade de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferase central eliminada, reduzida ou inibida. O termo *atividade de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferase central* abrange a expressão do gene de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferase central, bem como interação da enzima  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferase central com seu substrato.

[000139] Conforme aqui usado, o termo *citotoxicidade celular Fc-mediada* inclui citotoxicidade celular anticorpo-dependente e citotoxicidade celular mediada por uma proteína de fusão-Fc solúvel



contendo uma região Fc humana. Ela é um mecanismo imune que leva à lise de “células anticorpo-objetivadas” por “células efetadoras imunes humanas”, em que:

[000140] As *células efetadoras imunes humanas* são uma população de leucócitos que mostram receptores Fc sobre sua superfície, através do quais elas se ligam à região Fc de anticorpos ou proteínas de fusão-Fc e desempenham funções efetadoras. Tal população pode incluir, mas não está limitada a células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e/ou células assassinas naturais (NK).

[000141] As *células anticorpo-objetivadas* são células ligadas pelos anticorpos ou proteínas de fusão-Fc. Os anticorpos ou proteínas de fusão-Fc se ligam às células-alvo via a parte de proteína N-terminal da região Fc.

[000142] Conforme usado aqui, o termo *citotoxicidade celular Fc-mediada aumentada* é definido como um aumento no número de “células anticorpo-objetivadas” que são submetidas à lise em um determinado tempo, em uma determinada concentração de anticorpo ou uma proteína de fusão-Fc, no meio que circunda as células-alvo, através do mecanismo de citotoxicidade celular Fc-mediada definido acima e/ou uma redução na concentração de anticorpo ou uma proteína de fusão-Fc, no meio que circunda as células-alvo, requerido para obter a lise de um determinado número de “células anticorpo-objetivadas” em um determinado tempo, através do mecanismo de citotoxicidade celular anticorpo-mediada. O aumento na citotoxicidade celular Fc-mediada é com relação à citotoxicidade celular mediada pelo menos anticorpo ou proteína de fusão-Fc, produzida pelo mesmo tipo de células hospedeiras usando os mesmos métodos padrões de produção, purificação, formulação e armazenamento, os quais são conhecidos por aqueles versados na técnica, mas que não foram

produzidas por células hospedeiras manipuladas para expressar a glicosiltransferase GnTIII através dos métodos descritos aqui.

[000143] Por *anticorpo tendo citotoxicidade celular anticorpo-dependente aumentada (ADCC)* entenda-se um anticorpo, conforme esse termo é definido aqui, tendo ADCC aumentada, conforme determinado através de qualquer método adequado conhecido por aqueles versados na técnica. Um ensaio de ADCC aceito é descrito nos Exemplos apresentados aqui abaixo. Outro ensaio de ADCC *in vitro* aceito é como segue:

- 1) o ensaio usa células-alvo que são conhecidas por expressar o antígeno-alvo reconhecido pela região de ligação a antígeno do anticorpo;

- 2) o ensaio usa células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) isoladas de sangue de um doador saudável aleatoriamente escolhido, como células efetadoras;

- 3) o ensaio é realizado de acordo com o seguinte protocolo:

- i) as PBMCs são isoladas usando procedimentos de centrifugação em densidade padrões e são suspensas a  $5 \times 10^6$  células/ml em meio de cultura de célula RPMI;

- ii) as células-alvo são crescidas através de métodos de cultura tecidual padrões, coletadas da fase de crescimento exponencial com uma viabilidade maior do que 90%, lavadas em meio de cultura de célula RPMI, rotuladas com 100 micro-Curies de  $^{51}\text{Cr}$ , lavadas duas vezes com meio de cultura de células e resuspensas em meio de cultura de célula em uma densidade de  $10^5$  células/ml;

- iii) 100 microlitros da suspensão de célula-alvo final acima são transferidos para cada cavidade de uma lâmina de microtitulação com 96 cavidades;

- iv) o anticorpo é serialmente diluído de 4000 ng/ml para 0,04 ng/ml em meio de cultura de célula e 50 microlitros das soluções

de anticorpo resultantes são adicionados às células-alvo na lâmina de microtitulação com 96 cavidades, testando em triplicata várias concentrações de anticorpo cobrindo a faixa de concentração toda acima;

v) para controles com liberação máxima (MR), 3 cavidades adicionais na lâmina contendo as células-alvo rotuladas recebem 50 microlitros de uma solução aquosa a 2% (V/V) de detergente não-iônico (Nonidet, Sigma, St. Louis), ao invés da solução de anticorpo (ponto iv acima);

vi) para controles de liberação espontânea (SR), 3 cavidades adicionais na lâmina contendo as células-alvo rotuladas recebem 50 microlitros de meio de cultura de células RMPI ao invés da solução de anticorpo (ponto iv acima);

vii) a lâmina de microtitulação com 96 cavidades é, então, centrifugada a 50 x g durante 1 minuto e incubada durante 1 hora a 4 °C;

viii) 50 microlitros da suspensão de PMBC (ponto i acima) são adicionados a cada cavidade para proporcionar uma proporção de células efetadoras:alvo de 25:1 e as lâminas são colocadas em uma incubadora sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 4 horas;

ix) o sobrenadante isento de células de cada cavidade é coletado e a radioatividade experimentalmente liberada (ER) é quantificada usando um contador gama;

x) o percentual de lise específica é calculado para cada concentração de anticorpo de acordo com a fórmula  $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ , onde ER é a radioatividade média quantificada (vide ponto ix acima) para essa concentração de anticorpo, MR é a radioatividade média quantificada (vide ponto ix acima) para os controles de MR (vide ponto v acima) e SR é a radioatividade média quantificada (vide ponto ix acima) para os controles de SR (vide ponto vi acima);

4) “ADCC aumentada” é definida como um aumento no percentual máximo de lise específica observada dentro da faixa de concentração de anticorpo testada acima e/ou uma redução na concentração de anticorpo requerida para obter metade do percentual máximo de lise específica observado dentro da faixa de concentração de anticorpo testada acima. O aumento na ADCC é com relação à ADCC, medida com o ensaio acima, mediada pelo mesmo anticorpo, produzida pelo mesmo tipo de células hospedeiras, usando os mesmos métodos padrões de produção, purificação, formulação e armazenamento, os quais são conhecidos por aqueles versados na técnica, mas que não foi produzida por células hospedeiras manipuladas para superexpressar GnTIII.

Molécula de Ligação a Antígeno com Substituições de Aminoácido de Cadeia Pesada e/ou Cadeia Leve

[000144] Em um aspecto, a presente invenção é dirigida à ABMs compreendendo regiões V e/ou regiões C de cadeia pesada e/ou cadeia leve e à descoberta de que a capacidade dessas ABMs de produzir atividade de sinalização celular induzida de um antígeno-alvo e/ou mediar a reticulação de antígeno-alvo pode ser intensificada (isto é, induzida ou aumentada) ou reduzida (isto é, inibida ou diminuída) através de tais modificações. Assim, a presente invenção proporciona polipeptídeos, incluindo ABMs, tendo regiões V e/ou regiões C de cadeia pesada e/ou cadeia leve modificadas, seqüências de ácido nucléico (por exemplo, vetores) que codificam tais polipeptídeos, métodos para a geração de polipeptídeos tendo regiões V e/ou regiões C de cadeia pesada e/ou cadeia leve modificadas e métodos para uso dos mesmos no tratamento de várias doenças e distúrbios.

[000145] Sabe-se que vários mecanismos estão envolvidos na eficácia terapêutica de anticorpos, incluindo citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), citotoxicidade complemento-

dependente (CDC) e a indução de interrupção de crescimento ou apoptose e o bloqueio ou inibição de crescimento celular, proliferação celular, sobrevivência celular e/ou outros eventos celulares. Por exemplo, casos de indução de morte celular e outros eventos de sinalização celular por anticorpos monoclonais agonistas foram reportados. Cerisano e outros mostraram a indução de morte celular caspase-dependente caracterizada por características semelhantes à apoptose (incluindo exposição à fosfatidil-serina (PS), alterações morfológicas e/ou captação de iodeto de propídio (PI)), bem como agregação homotípica de células de sarcoma de Ewing, através de estimulação com anticorpos agonistas contra a glicoproteína na transmembrana, CD99 (por exemplo, MAb anti-CD99013 e MAb 0662) (Cerisano e outros, *Oncogene* 23: 5664-5674 (2003)). Da mesma forma, Hahn e outros reportaram a ativação de vias de sinalização de MAPK através de encaixe de CD99 com anticorpos monoclonais anti-CD99 (por exemplo, DN16 e YG32), os quais levaram à agregação homotípica de células (Hahn e outros, *FEBS Letters* 470: 350-354 (2000)). Pettersen e outros identificaram um novo domínio funcional de CD99 que pôde ser ativado pelo anticorpo monoclonal anti-CD99, Ad20, ativação a qual induziu à apoptose em células T transformadas (Pettersen e outros, *J. Immunol.* 166: 4931-4942 (2001)). Anticorpos monoclonais contra CD47 (por exemplo, B6H12) também podem induzir à morte celular caspase-dependente, a qual está associada às vias de sinalização de reorganização citoesquelética (Mateo e outros, *Blood* 100: 2882- 2890 (2002)). Cada uma das referências acima é incorporada aqui por referência em sua totalidade.

[000146] Em outros exemplos, foi mostrado que determinados anticorpos contra CD20 (por exemplo, rituximab e tositumomab) e CD52 (CAMPATH-1H) induzem diretamente à apoptose em células tumorígenas. Vide Ludwig e outros, *Oncogene* 22: 9097-9106 (2003).

Para o rituximab e vários outros anticorpos monoclonais com pouca ou nenhuma atividade de sinalização (anti-CD19, CD21, CD22 e Her2), a capacidade de induzir à apoptose ou interromper o crescimento foi intensificada através de conversão química dos anticorpos em homodímeros de IgG-IgG. Ghetie e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci* 94: 7509-14 (1997). Foi especulado que a intensificação foi em virtude de sinalização negativa aumentada e/ou hiper-cruzamento através dos homodímeros de anticorpo tetravalentes. Ghetie e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7509-14 (1997). Reticulação e apoptose aumentada também foram obtidas através do uso de anticorpos secundários ou células acessórias trazendo receptor Fc. Vide Jazhirehi e Bonavida, *Oncogene* 24: 2121-43 (2005). Cada uma das referências mencionadas acima é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[000147] Sem desejar estar preso à teoria, os presentes inventores determinaram que modificações nos resíduos de aminoácido na região de dobradiça de cotovelo de uma molécula de ligação a antígeno podem afetar a capacidade da ABM de induzir ou inibir a atividade de sinalização e/ou reticulação de antígeno-alvo. O ângulo da região de dobradiça de cotovelo controla a orientação da região V com relação à região C de uma imunoglobulina e, como tal, facilita as interações de anticorpos com antígeno e proteínas efetadoras. Vide Lesk e Chothia, *Nature* 335: 188-90 (1988). Lesk e Chothia identificaram os resíduos que compõem a união em esfera-e-soquete molecular da região de dobradiça de cotovelo em anticorpos, isto é, posições 11, 110 e 112 de Kabat na região VH e posições 149 e 150 na região CH1, e notaram o alto grau de conservação, através dos anticorpos, de resíduos que compõem essa união. Lesk e Chothia, *Nature* 335: 188-90 (1988) (aqui incorporados por referência em sua totalidade). Contudo, eles não fizeram modificações nos resíduos da esfera-e-soquete ou nos

resíduos em sua proximidade. Landolfi e outros mostraram que modificações nas posições 10-13 de Kabat no AF2, um anticorpo de neutralização contra IFN $\gamma$  humano, resultou em uma perda significativa na atividade de neutralização do anticorpo, mas não afetou a ligação do anticorpo a seu antígeno-alvo. Landolfi e outros, *J. Immunol.* 166: 1748-54 (2001) (aqui incorporado por referência em sua totalidade). Contudo, Landolfi e outros não mostraram um efeito sobre a capacidade de um anticorpo de induzir à sinalização celular ou mediar a reticulação a antígeno.

[000148] Com uma ABM multivalente, a capacidade de alterar a orientação dos sítios de ligação a antígeno permite ajustar a proximidade de unidades de antígeno ligadas quando elas estão em complexo com os múltiplos sítios de ligação a antígeno. A proximidade das unidades antigênicas umas com as outras facilita maior ou menor interação (por exemplo, reticulação, dimerização, etc.) entre as unidades antigênicas. Por exemplo, se o ângulo de cotovelo de cada par VH/VL-CH1/CL em uma ABM é orientado de modo que os sítios de ligação a antígeno são mantidos em proximidade íntima uns com os outros, as unidades antigênicas ligadas (por exemplo, moléculas de receptor na superfície) também serão mantidas em proximidade íntima umas com as outras ou mantidas em uma conformação que é mais favorável para interação. Essa proximidade ou alteração conformacional pode mediar interações, por exemplo, reticulação e oligomerização, entre os antígenos ligados. Por outro lado, orientação dos sítios de ligação a antígeno de modo que eles estejam afastados ou tenham uma conformação menos favorável pode impedir os mesmos de interagir.

[000149] Resíduos de aminoácido na interface VL-CL também podem ser modificados para afetar a orientação do sítio de ligação a antígeno. Por exemplo, os resíduos 40, 80, 83, 105 e 106 de Kabat

nas *frameworks* de região variável de cadeia leve estão localizados na interface VL/CL.

[000150] A atividade de quaisquer mecanismos de sinalização celular pode ser afetada (isto é, induzida ou inibida) pelas ABMs da presente invenção. Em um aspecto da invenção, os mecanismos de sinalização celular envolvidos são aqueles iniciados através de proteínas de receptor na superfície celular, incluindo proteínas de receptor na superfície celular canal de íons-ligadas, proteína G-ligadas e enzima-ligadas. Vide, de modo geral, Capítulo 15: Cell Signaling em MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, Alberts e outros, eds., (3ª ed. 1994) (incorporado aqui por referência). Assim, por exemplo, as atividades de sinalização celular da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, aquelas as quais resultam em apoptose, diferenciação celular, crescimento celular, proliferação celular e sobrevivência celular, bem como qualquer uma das etapas de sinalização ao longo da via. Em uma modalidade, a atividade de sinalização celular ocorre através de um receptor enzima-ligado; em uma modalidade particular, o receptor enzima-ligado é uma quinase de tirosina de receptor. Em outra modalidade, a atividade de sinalização celular é através de um receptor canal de íons-ligado.

[000151] As regiões V e/ou regiões C de cadeia pesada ou cadeia leve modificadas das ABMs da presente invenção diferem das regiões do polipeptídeo precursor não modificado (por exemplo, uma molécula de ligação a antígeno precursora) por pelo menos uma substituição de aminoácido. O polipeptídeo “precursor”, “de iniciação” ou “não modificado” compreende, de preferência, pelo menos uma porção de uma cadeia pesada ou cadeia leve de anticorpo e pode ser preparado usando métodos disponíveis na técnica para a geração de polipeptídeos compreendendo uma região V de cadeia pesada ou região CH1 ou porção das mesmas e/ou uma cadeia leve C ou região



C ou porção da mesma. Em modalidades específicas, o polipeptídeo precursor é uma molécula de ligação a antígeno e compreende pelo menos uma porção de uma região VH ou VL. Em determinadas modalidades, uma região V de cadeia pesada e/ou de cadeia leve modificada pode ser gerada (por exemplo, de acordo com os métodos descritos aqui) e pode ser fundida a um polipeptídeo heterólogo de escolha, tal como um anticorpo Fc. Em uma modalidade da presente invenção, uma ABM modificada ou fragmento da mesma compreende uma proteína de fusão, em que uma região V de cadeia pesada modificada ou fragmento da mesma é fundida a uma região constante de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo em IgA, IgG, IgE, IgD e IgM ou um fragmento ou derivado da mesma. Em uma modalidade particular, a região constante de cadeia pesada é IgG. Em outra modalidade da presente invenção, uma ABM modificada ou fragmento da mesma compreende uma proteína de fusão, em que uma região V de cadeia leve modificada ou fragmento da mesma é usado para fundir a uma região constante de cadeia leve selecionada do grupo consistindo em IgA, IgG, IgE, IgD e IgM ou um fragmento ou derivado da mesma. Em uma modalidade particular, a região constante de cadeia leve é IgG. Em modalidades específicas, os polipeptídeos da invenção compreendem um anticorpo inteiro (por exemplo, IgG) compreendendo cadeias leves e cadeias pesadas tendo uma região V de cadeia pesada e/ou de cadeia leve modificada.

[000152] Polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo compreendendo uma região V de cadeia pesada modificada ou região CH1 ou região V de cadeia leve ou região CL podem ser preparados através de métodos conhecidos na técnica usando a orientação do presente relatório descritivo para seqüências particulares. Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, preparação, através de mutagênese sítio-dirigida (ou oligonucleotídeo-mediada), mutagênese

por PCR e mutagênese por cassete, de um ácido nucléico previamente preparado que codifica o polipeptídeo. Mutagênese sítio-dirigida é um método preferido para preparação de variantes com substituição. Esse método é bem-conhecido na técnica (vide, por exemplo, Carter e outros, *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985) e Kunkel e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82: 488 (1987), ambos os quais são aqui incorporados por referência). Resumidamente, na realização de mutagênese sítio-dirigida de DNA, o DNA de iniciação é alterado primeiro através de hibridização de um oligonucleotídeo que codifica a mutação desejada em um único filamento de tal DNA de iniciação. Após hibridização, uma DNA polimerase é usada para sintetizar uma segunda filamento inteira, usando o oligonucleotídeo hibridizado como um iniciador e usando o único filamento do DNA de iniciação como um modelo. Assim, o oligonucleotídeo que codifica a mutação desejada é incorporado no DNA do filamento duplo resultante.

[000153] Mutagênese por PCR é também adequada para fazer variantes de seqüência de aminoácido do polipeptídeo de iniciação não modificado (vide, por exemplo, Vallette e outros, *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989), incorporado aqui por referência). Resumidamente, quando pequenas quantidades do DNA *modelo* são usadas como material de iniciação em uma PCR, iniciadores que diferem ligeiramente quanto à seqüência da região correspondente em um DNA *modelo* podem ser usados para gerar quantidades relativamente grandes de um fragmento de DNA específico que difere da seqüência do *modelo* apenas nas posições onde os iniciadores diferem do *modelo*.

[000154] Outro método para a preparação de variantes de ABM, mutagênese por cassete, é baseado na técnica descrita por Wells e outros, *Gene* 34: 315-323 (1985), incorporado aqui por referência. O

material de iniciação é o plasmídeo (ou outro vetor) compreendendo o DNA de polipeptídeo de iniciação a ser modificado. O(s) códon(s) no DNA de iniciação a sofrer mutação é(são) identificado(s). Deve haver um único sítio de endonuclease de restrição sobre cada lado do(s) sítio(s) de mutação identificado(s). Se nenhum de tais sítios de restrição existe, eles podem ser gerados usando o método de mutagênese oligonucleotídeo-mediada descrito acima para introduzir os mesmos em locais apropriados no DNA do polipeptídeo de iniciação. O DNA de plasmídeo é cortado nesses sítios para linearizá-lo. Um oligonucleotídeo de filamento duplo que codifica a seqüência do DNA entre os sítios de restrição, mas contendo a(s) mutação(ões) desejada(s) é sintetizado usando procedimentos padrões, em que os dois filamentos do oligonucleotídeo são sintetizados separadamente e, então, hibridizados juntos usando técnicas padrões. Esse oligonucleotídeo de filamento duplo é referido como o cassete. Esse cassete é projetado para ter extremidades 5' e 3' que são compatíveis com as extremidades do plasmídeo linearizado, de modo que ele pode ser diretamente ligado ao plasmídeo. Esse plasmídeo agora contém a seqüência de DNA com mutação.

[000155] Alternativa ou adicionalmente, a seqüência de aminoácido desejada que codifica uma variante polipeptídica pode ser determinada e uma seqüência de ácido nucléico que codifica tal variante de seqüência de aminoácido pode ser gerada sinteticamente.

[000156] A seqüência de aminoácido do polipeptídeo precursor pode ser modificada para gerar uma ABM tendo uma região V de cadeia pesada modificada e/ou região CH1 modificada e/ou uma região V de cadeia leve modificada e/ou região CL modificada, com capacidade alterada de induzir à atividade de sinalização celular de um antígeno-alvo quando a ABM modificada está em complexo com (por exemplo, ligada a) o antígeno-alvo. A atividade de sinalização celular pode ser

atividade agonista ou atividade antagonista. De acordo com um aspecto da invenção, atividade agonista é induzida por uma molécula de ligação a antígeno-modificada quando ela se liga a um receptor membrana celular-associado e inicia uma via de sinalização celular. Em uma modalidade específica, a via de sinalização celular é uma via de apoptose. Em outra modalidade, a via de sinalização celular é uma via de diferenciação celular. De acordo com outro aspecto da invenção, atividade antagonista por uma molécula de ligação a antígeno-modificada ocorre, por exemplo, quando a ABM se liga a um receptor membrana celular-associado e impede a indução de uma via de sinalização celular ou rompe um sinal em andamento. Atividade antagonista pode ser obtida, por exemplo, através de bloqueio da ligação e subsequente transdução de sinal de um ligante endógeno e/ou impedindo a reticulação ou oligomerização de receptores ou outras moléculas que seriam necessárias para a indução de uma via de sinalização celular. Em uma modalidade, a via de sinalização celular que é inibida ou rompida é uma via de crescimento celular. Em outra modalidade, a via de sinalização celular que é inibida ou rompida é uma via de divisão celular. Em outra modalidade, a via de sinalização celular que é inibida ou rompida é uma via de sobrevivência celular.

[000157] Da mesma forma, a seqüência de aminoácido do polipeptídeo precursor pode também ser modificada para gerar uma ABM tendo uma região V de cadeia pesada modificada ou região C modificada (por exemplo, uma região CH1 modificada) e/ou uma região V de cadeia leve modificada e/ou região CL modificada, com capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo quando a ABM modificada está em complexo com (por exemplo, ligada a) o(s) antígeno(s) alvo. Em uma modalidade, os antígenos-alvo ligados (por exemplo, moléculas de receptor na superfície celular) são

mantidos em proximidade íntima uns com os outros e/ou uma conformação mais favorável para interação do que eles estariam pela ABM precursora não modificada correspondente, desse modo, aumentando a reticulação e oligomerização entre os antígenos. Em outra modalidade, os antígenos-alvo ligados (por exemplo, moléculas de receptor na superfície celular) são mantidos afastados uns dos outros e/ou em uma conformação menos favorável para interação do que eles estariam pela ABM precursora não modificada correspondente, desse modo, reduzindo ou impedindo a reticulação e oligomerização entre os antígenos ligados. Em uma modalidade particular, a reticulação ou oligomerização aumentada resulta em apoptose aumentada. Em outra modalidade, a reticulação ou oligomerização aumentada resulta em diferenciação celular aumentada. Em outra modalidade, a redução na reticulação ou oligomerização resulta em crescimento celular diminuído, divisão celular diminuída ou sobrevivência celular diminuída.

[000158] Modificações substanciais nas propriedades biológicas da região V de cadeia pesada ou região CH1 ou na região V de cadeia leve ou região CL podem ser realizadas selecionando substituições que diferem significativamente quanto a seu efeito sobre a manutenção de (a) a estrutura da parte principal do polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo ou (c) o volume da cadeia lateral. Resíduos que ocorrem naturalmente estão divididos em classes baseado em propriedades em comum da cadeia lateral:

- (1) hidrofóbicos: met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação de cadeia: gly, pro; e

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[000159] Substituições não conservativas requererão troca de um membro de uma dessas classes por um membro de outra classe. Substituições conservativas requererão troca de um membro de uma dessas classes por outro membro da mesma classe.

#### Polipeptídeos Exemplificativos Compreendendo ABMs Modificadas

[000160] Em um aspecto, a presente invenção é relacionada à moléculas de ligação a antígeno com modificações de aminoácido que alteram a capacidade das ABMs de induzir à atividade de sinalização celular e/ou mediar a reticulação de antígenos. Em uma modalidade, a modificação da ABM compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido em pelo menos uma região de "*framework*" da região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve quando comparado com uma molécula precursora. Em uma modalidade particular, a substituição substitui um resíduo de aminoácido na FR1 de cadeia pesada. Em uma modalidade preferida, a modificação na ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 de Kabat na região variável de cadeia pesada. Em outra modalidade, a modificação na ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido na FR4 de cadeia pesada. Em uma modalidade particular, a modificação na ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das posições 110 ou 112 de Kabat na região variável de cadeia pesada. Em outra modalidade, a modificação na ABM compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido na cadeia leve na interface entre as regiões V e C. Em uma modalidade mais particular, a modificação na ABM compreende uma substituição de um resíduo de aminoácido em uma ou mais das

posições 40, 80, 83, 105 ou 106 de Kabat.

[000161] Em uma modalidade, um aminoácido pode ser substituído através de geração de uma mutação de ponto na seqüência precursora que resulta na alteração desejada no(s) resíduo(s) de aminoácido. Alternativamente, a modificação na ABM pode compreender substituição de uma região de *"framework"* inteira de uma molécula precursora por uma região de *"framework"* que compreende um resíduo de aminoácido desejado em uma posição em particular. Em uma modalidade particular, a modificação na ABM compreende substituição da FR1 de uma molécula precursora pela FR1 codificada pela seqüência de um gene variável de linhagem germinativa.

[000162] Em outra modalidade da invenção, a ABM compreende pelo menos uma região CH1 e modificação da ABM compreende pelo menos uma substituição de resíduo de aminoácido quando comparado com um polipeptídeo precursor. Em uma modalidade em particular, a modificação da ABM compreende substituição de um ou mais resíduos de aminoácido nas posições 148, 149 e/ou 150 na região variável de cadeia pesada.

[000163] Em outro aspecto, a invenção é dirigida à moléculas de ligação a antígeno-modificadas compreendendo uma ou mais CDRs truncadas de uma molécula de ligação a antígeno precursora. Tais CDRs truncadas conterão, no mínimo, os resíduos de aminoácido de determinação de especificidade para a dada CDR. Por "resíduo de determinação de especificidade" entenda-se aqueles resíduos que estão diretamente envolvidos na interação com o antígeno. Em geral, apenas cerca de um quinto a um terço dos resíduos em uma dada CDR participam da ligação a antígeno. Os resíduos de determinação de especificidade em uma CDR em particular podem ser identificados, por exemplo, através de computação de contatos interatômicos a partir

de modelamento tridimensional e determinação da variabilidade de seqüência em uma dada posição de resíduo de acordo com os métodos descritos em Padlan e outros, *FASEB J.* 9(1): 133-139 (1995), os conteúdos do qual são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

[000164] Conseqüentemente, a invenção é também dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo pelo menos uma região de determinação de complementaridade de uma molécula precursora ou uma variante ou forma truncada da mesma contendo pelo menos os resíduos de determinação de especificidade para a referida região de determinação de complementaridade, em que o referido polinucleotídeo isolado codifica um polipeptídeo de fusão. De preferência, tais polinucleotídeos isolados codificam um polipeptídeo de fusão que é uma molécula de ligação a antígeno-modificada. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende três regiões de determinação de complementaridade da molécula precursora ou variantes ou formas truncadas das mesmas contendo pelo menos os resíduos de determinação de especificidade para cada uma das referidas três regiões de determinação de complementaridade. Em outra modalidade, o polinucleotídeo codifica a região variável inteira da cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo quimérico (por exemplo, humanizado). A invenção é ainda dirigida a polipeptídeos codificados por tais polinucleotídeos.

[000165] Em outra modalidade, a invenção é dirigida a uma molécula de ligação a antígeno-modificada compreendendo pelo menos uma região de determinação de complementaridade de uma molécula precursora ou uma variante ou forma truncada da mesma contendo pelo menos os resíduos de determinação de especificidade para a referida região de determinação de complementaridade e compreendendo uma seqüência derivada de um polipeptídeo



heterólogo. Em uma modalidade, a molécula de ligação a antígeno-modificada compreende três regiões de determinação de complementaridade da molécula precursora ou variantes ou formas truncadas das mesmas contendo pelo menos os resíduos de determinação de especificidade para cada uma das referidas três regiões de determinação de complementaridade. Em outro aspecto, a molécula de ligação a antígeno-modificada compreende a região variável de uma cadeia leve ou pesada de anticorpo. Em uma modalidade particularmente útil, a molécula de ligação a antígeno é um anticorpo quimérico, por exemplo, humanizado. A invenção é também dirigida a métodos de fabricação de tais moléculas de ligação a antígeno-modificadas e ao uso das mesmas no tratamento de uma doença, incluindo distúrbios de proliferação celular.

[000166] Sabe-se que vários mecanismos estão envolvidos na eficácia terapêutica de anticorpos, incluindo citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), citotoxicidade complemento-dependente (CDC) e indução de interrupção de crescimento, diferenciação celular ou apoptose.

[000167] A presente invenção é dirigida à ABMs modificadas que têm capacidade aumentada de induzir à apoptose comparado com a ABM precursora não modificada correspondente. Por exemplo, uma ABM precursora que tem pouca ou nenhuma capacidade de induzir à apoptose pode ser modificada de acordo com a presente invenção para gerar uma ABM modificada que tem a capacidade de induzir à apoptose ou que tem a capacidade aumentada de induzir à apoptose. A presente invenção é também dirigida à ABMs modificadas que têm capacidade aumentada de induzir à interrupção de crescimento ou diferenciação celular quando comparada com a ABM precursora não modificada correspondente. Por exemplo, uma ABM precursora que tem pouca ou nenhuma capacidade de induzir à interrupção de

crescimento ou diferenciação celular pode ser modificada de acordo com a presente invenção para gerar uma ABM modificada que tem a capacidade de induzir à interrupção de crescimento ou diferenciação ou que tem uma capacidade aumentada de induzir à interrupção de crescimento ou diferenciação.

[000168] Com relação a anticorpos anti-CD20 em particular, por exemplo, a maioria da evidência experimental indica que o rituximab opera através de mecanismos efetadores convencionais medidos através de ensaios de CDC e ADCC. Similarmente, foi mostrado que a resistência de diferentes células de linfoma ao rituximab *in vivo* é uma função de sua sensibilidade à CDC *in vitro*. Em contraste, o modo de ação *in vivo* de outro anticorpo anti-CD20 que foi aprovado para uso terapêutico, B1, não requer atividade de complemento nem de células assassinas naturais (NK). Antes, a eficácia do B1 *in vivo* é em virtude de sua capacidade de induzir à apoptose potente. Em geral, anticorpos monoclonais anti-CD20 caem em duas categorias distintas, baseado em seu mecanismo de ação na erradicação de células de linfoma. Anticorpos anti-CD20 do tipo I utilizam primariamente a complemento para matar as células-alvo, enquanto que anticorpos do tipo II operam através de mecanismos diferentes, primariamente apoptose. Rituximab e 1F5 são exemplos de anticorpos anti-CD20 do tipo I, enquanto que B1 é um exemplo de um anticorpo do tipo II. Vide, por exemplo, Cragg, M.S. e Glennie, M.J., *Blood* 103(7): 2738-2743 (Abril de 2004); Teeling, J.L. e outros, *Blood* 104(6): 1793-1800 (Setembro de 2004), os conteúdos todos dos quais são aqui incorporados por referência.

[000169] O Pedido de Patente U.S. Publicado No. 2005/0123546 para Umafia e outros (o qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade) descreve o primeiro caso conhecido no qual um anticorpo anti-CD20 do tipo I foi manipulado para ter funções efetadoras aumentadas, tal como ADCC, e gerar capacidade potente de

apoptose, alterando eficazmente o anticorpo anti-CD20 do tipo I em um anticorpo anti-CD20 do tipo II. Em uma modalidade, a presente invenção é dirigida a um anticorpo anti-CD20 modificado compreendendo uma substituição em uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve comparado com um anticorpo anti-CD20 precursor do tipo I, em que as substituições resultam em uma indução aumentada de apoptose pelo anticorpo anti-CD20 modificado. Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a anticorpos anti-CD20 do tipo II manipulados tendo ADCC aumentada como um resultado de manipulação para função efetuada aumentada e sem perda de capacidade substancial de induzir à apoptose. Em uma modalidade, os anticorpos anti-CD20 do tipo II compreendem uma substituição em um ou mais aminoácidos na região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve comparado com uma molécula precursora. Em outra modalidade, os anticorpos anti-CD20 do tipo I e/ou do tipo II foram manipulados para ter um padrão alterado de glicosilação na região Fc. Em uma modalidade particular, a glicosilação alterada da ABM modificada compreende um nível aumentado de resíduos de complexo bisseccionado na região Fc. Em outra modalidade particular, a glicosilação alterada da ABM modificada compreende um nível reduzido de resíduos de fucose na região Fc. Vide Pub. de Pedido de Patente U.S. No.20040093621 para Shitara e outros, os conteúdos todos da qual são incorporados por referência. Em outra modalidade, os anticorpos anti-CD20 do tipo I e/ou do tipo II sofreram manipulação de polipeptídeo, conforme ensinado na Pat. U.S. No. 6.737.056 para Presta ou Pub. de Pedido de Patente U.S. No. 2004 0185045 (Macrogenics) ou Pub. de Pedido de Patente U.S. No. 2004 0132101 (Xencor), os conteúdos todos das quais são aqui incorporados por referência. A invenção é ainda dirigida a métodos de fabricação de tais anticorpos do tipo I ou do tipo II manipulados e a métodos de uso de

tais anticorpos no tratamento de vários distúrbios de células B, incluindo linfomas de células B.

#### ABMs Quiméricas e Humanizadas Modificadas

[000170] Anticorpos de camundongo/humanos quiméricos foram descritos. Vide, por exemplo, Morrison, S. L. e outros, *PNAS* 11: 6851-6854 (Novembro de 1984); Publicação de Patente Européia No. 173494; Boulianna, G. L. e outros, *Nature* 312: 642 (Dezembro de 1984); Neubeiger, M. S. e outros, *Nature* 314: 268 (Março de 1985); Publicação de Patente Européia No. 125023; Tan e outros, *J Immunol.* 135: 8564 (Novembro de 1985); Sun, L. K e outros, *Hybridoma* 5(1): 517 (1986); Sahagan e outros, *J. Immunol.* 137: 1066- 1074 (1986). Vide, de modo geral, Muron, *Nature* 312: 597 (Dezembro de 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5(3) (Março de 1985); Marx, *Science* 229: 455 (Agosto de 1985); e Morrison, *Science* 229: 1202-1207 (Setembro de 1985). Robinson e outros, na Publicação PCT Número WO/88104936 descrevem um anticorpo quimérico com uma região constante humana e uma região variável de murino, tendo especificidade por um epítopo de CD20; a porção de murino do anticorpo quimérico das referências de Robinson é derivada do anticorpo monoclonal de camundongo 2H7 (gama 2b, kapa). Embora a referência mencione que o anticorpo quimérico desejado é um “candidato a prime” para o tratamento de distúrbios de células B, essa afirmação pode ser encarada como não mais do que uma sugestão por aqueles versados na técnica para determinar se essa sugestão é precisa ou não para esse anticorpo em particular, particularmente porque a referência carece de quaisquer dados para sustentar uma afirmativa de eficácia terapêutica e, de modo importante, dados usando mamíferos de ordem superior, tais como primatas ou seres humanos.

[000171] Metodologias para a geração de anticorpos quiméricos estão disponíveis para aqueles versados na técnica. Por exemplo, as cadeias

leve e pesada podem ser expressas separadamente usando, por exemplo, a cadeia leve de imunoglobulina e cadeias pesadas de imunoglobulina em plasmídeos separados ou sobre um único vetor (por exemplo, policistônico). Essas podem ser purificadas e montadas *in vitro* em anticorpos completos; metodologias para realizar tal montagem foram descritas. Vide, por exemplo, Scharff, M., *Harvey Lectures* 69: 125 (1974). Parâmetros de reação *in vitro* para a formação de anticorpos de IgG a partir de cadeias leves e pesadas isoladas também foram descritos. Vide, por exemplo, Sears e outros, *Biochem.* 16(9): 2016-25 (1977).

[000172] Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM quimérica da presente invenção é um anticorpo humanizado. Métodos para humanização de anticorpos não-humanos são conhecidos na técnica. Por exemplo, ABMs humanizadas da presente invenção podem ser preparadas de acordo com os métodos da Pat. U.S. No. 5.225.539 para Winter, Pat. U.S. No. 6.180.370 para Queen e outros ou Pat. U.S. No. 6.632.927 para Adair e outros, Pub. de Pedido de Pat. U.S. No. 2003/0039649 para Foote; Pub. de Pedido de Pat. U.S. No. 2004/0044187 para Sato e outros; ou Pub. de Pedido de Pat. U.S. No. 2005/0033028 para Leung e outros, os conteúdos todos de cada uma das quais são aqui incorporados por referência. De preferência, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos a partir de uma fonte a qual é não-humana. Esses resíduos de aminoácido não-humanos são freqüentemente referidos como resíduos “importados”, os quais são, tipicamente, tomados de um domínio variação de “importação”. Humanização pode ser realizada essencialmente seguindo o método de Winter e outros (Jones e outros, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann e outros, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen e outros, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), através de substituição de seqüências de região hiper-variável pelas seqüências

correspondentes de um anticorpo humano. Conseqüentemente, tais anticorpos “humanizados” são anticorpos quiméricos (Pat. U.S. No. 4.816.567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, anticorpos humanizados são, tipicamente, anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de região hiper-variável e possivelmente alguns resíduos de Fr são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores. Os anticorpos anti-CD20 humanizados em questão compreenderão regiões constantes de imunoglobulina humana.

[000173] A escolha de domínios variáveis humanos, leves e pesados, a serem usados na fabricação dos anticorpos humanizados é de muita importância para reduzir a antigenicidade. De acordo com o assim denominado método de “melhor adaptação”, a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada contra a biblioteca inteira de seqüências de domínio variável humana conhecidas. A seqüência humana a qual está mais próxima daquela do roedor é, então, aceita como a região de “*framework*” humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims e outros, *J. Immunol*, 151: 2296 (1993); Chothia e outros, *J Mol. Biol*, 196: 901 (1987)). Outro método de seleção da seqüência de “*framework*” humana é comparar a seqüência de cada sub-região individual da “*framework*” inteira de roedor (isto é, FR1, FR2, FR3 e FR4) ou alguma combinação das sub-regiões individuais (por exemplo, FR1 e FR2) contra uma biblioteca de seqüências de região variável humana conhecidas que correspondem à sub-região de “*framework*” humana (por exemplo, conforme determinado pela numeração de Kabat) e escolher a seqüência humana para cada sub-região ou combinação que é mais próxima daquela do roedor (Leung, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2003/0040606A1, publicada em 27 de Fevereiro de 2003). Outro método usa uma região de “*framework*” em particular

derivada da seqüência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo em particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma "framework" pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 4285 (1992); Presta e outros, *J Immunol.*, 151: 2623 (1993), os conteúdos todos de cada um dos quais são aqui incorporados por referência em suas totalidades).

[000174] É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção da alta afinidade pelo antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para obter esse objetivo, de acordo com um método preferido, anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das seqüências precursoras e vários produtos humanizados conceituais usando os modelos tridimensionais das seqüências precursoras e humanizadas. Modelos tridimensionais de imunoglobulina podem ser gerados usando programas de computador familiares para aqueles versados na técnica (por exemplo, exemplo Insightl, Accelrys Inc. (anteriormente MSI) ou em <http://swissmodel.expasy.org/> descrito por Schwede e outros, *Nucleic Acids Res.* 2003 (13): 3381-3385). Inspeção desses modelos permite análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da seqüência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar a seu antígeno. Dessa forma, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir do recipiente e seqüências de importação, de modo que a característica desejada do anticorpo, tal como manter afinidade pelo(s) antígeno(s) alvo, é obtida. Em geral, os resíduos da região hipervariável estão direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação a antígeno.

[000175] Em outra modalidade, as moléculas de ligação a antígeno da presente invenção são manipuladas para ter afinidade de ligação

intensificada, por exemplo, de acordo com os métodos descritos na Pub. de Pedido de Patente U.S. No. 2004/0132066 para Balint e outros, os conteúdos todos da qual são aqui incorporados por referência.

[000176] Em uma modalidade preferida, a presente invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido conforme mostrado nas Tabelas 3 e/ou 5 abaixo. A invenção é ainda dirigida a um ácido nucléico isolado compreendendo uma seqüência pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma seqüência de nucleotídeo mostrada nas Tabelas 2 e/ou 4 abaixo. Em outra modalidade, a invenção é dirigida a um ácido nucléico isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma seqüência de aminoácido nas Tabelas 3 e/ou 5 abaixo. A invenção também abrange um ácido nucléico isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácido de qualquer uma das estruturas nas Tabelas 3 e/ou 5, com substituições conservativas de aminoácido. Em determinadas modalidades, qualquer um dos polinucleotídeos ou polipeptídeos das Tabelas 2-5 pode ser excluído. Portanto, por exemplo, em determinadas modalidades, a ABM modificada e/ou o polinucleotídeo que codifica a ABM modificada não compreende qualquer ou todas de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 ou SEQ ID NO: 38. Em outro exemplo, em determinadas modalidades, a ABM modificada da presente invenção não compreende qualquer ou todas de SEQ ID NOs: 55-62.

[000177] Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido conforme mostrado nas Tabelas 3 e/ou 5 abaixo. A invenção é ainda dirigida a um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência



codificada por uma seqüência de nucleotídeo mostrada nas Tabelas 2 e/ou 4 abaixo. Em outra modalidade, a invenção é dirigida a um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma seqüência de aminoácido nas Tabelas 3 e/ou 5 abaixo. A invenção também abrange um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido de qualquer uma das estruturas nas Tabelas 3 e/ou 5, com substituições conservativas de aminoácido. Em determinadas modalidades, qualquer um dos polinucleotídeos ou polipeptídeos das Tabelas 2-5 pode ser excluído. Portanto, por exemplo, em determinadas modalidades, o polipeptídeo não compreende uma seqüência de aminoácido correspondendo a ou codificada por qualquer ou todas de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO: 37 ou SEQ ID NO: 38. Em outro exemplo, em determinadas modalidades, a ABM modificada da presente invenção não compreende qualquer ou todas de SEQ ID N<sup>os</sup>: 55-62.

Tabela 2

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HH1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAGCTGGGTGCG GCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACGCACAGA AATTCCAAGGAAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	1

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HH2	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCG GCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	3
B-HH3	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCG GCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATCTGTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACC	5
B-HH4	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGAGCTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTCTCCG GATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGG CAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACGGA TCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA TTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCAC TAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCTCA	7

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HH5	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAGCTGGGTGCG GCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	9
B-HH6	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATCAATTGGGTGCG GCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	11
B-HH7	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATCTCGTGGGTGCG GCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	13

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HH8	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACACCTTCACATACAGCTGGATGAACTGGGTGCG GCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	15
B-HH9	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCG GCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	17
B-HL1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACTGGGTGCG GCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACGCACAGA AATTCCAAGGAAGAGTCACAATGACACGGGACACGTCC ACTTCCACCGTCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	19

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HL2	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGGTGTCC GGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACTGGGTGCA GCAGGCCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACGCAGAGA AATTCCAAGGAAGAGTCACAATCACAGCCGACACGTCC ACTGACACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	21
B-HL3	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GCCTGGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGGTGTCC GGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCA GCAGGCCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGAAGAGTCACAATCACAGCCGACACGTCC ACTGACACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	23
B-HL4	CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAAGAA GACCGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCC GGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAGCTGGGTGCG GCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACGCACAGA AATTCCAAGGAAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACC	25

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HL8	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCA AGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCG GCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	27
B-HL10	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTTCGATTCAGCTATTCTTGGATGAA CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATT CTCGA	29
B-HL11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCA AGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCG GCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGACG GATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGGA AATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCC ACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCT TTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCA	31

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HL12	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGAGCAG GCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTG CGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAA CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATT CTCGA	33
B-HL13	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGAG GCGTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTG CGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAA CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATT CTCGA	35

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HL14	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGAGGAG GCTTGAAGAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTG CGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAA CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATT CTCGA	37
B-HL15	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCCCCTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTGGTCAAGCCTGGCTCTTCCCTGCGGCTCTCCTGC GCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAAC TGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGG TGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACTAC AATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCCGA CAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGA AATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCT CGA	39



Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-HL16	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGGTCAGCTG CGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAA CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATT CTCGA	41
B-HL17	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAGGA GCCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTG CGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAA CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATT CTCGA	43
Seqüência de Sinal VH	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGC AGCCACAGGAGCCCACTCC	45

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
B-KV1	GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCCGT CACCCTGGAGAGCCCGCCAGCATTAGCTGCAGGTCT AGCAAGAGCCTCTTGCACAGCAATGGCATCACTTATTT GTATTGGTACCTGCAAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGC TCCTGATTTATCAAATGTCCAACCTTGTCTCTGGCGTCC CTGACCGGTTCTCCGGATCCGGGTCAGGCACTGATTTC AACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTG GAGTTTATTACTGCGCTCAGAATCTAGAACTTCCTTACA CCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTAC GGTG	47
Seqüência de Sinal VL	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCTCC TGCTGCTCTGGTTCCAGGTGCCAGGTGT	49

Tabela 3

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO
B-HH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSYSWMS WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	2
B-HH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	4
B-HH2A	QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	124
B-HH2B	QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	125

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO
B-HH2C	QVQLVQSGGEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	126
B-HH2D	QVQLVQSGAGVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	127
B-HH2E	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVIVSS	128
B-HH2F	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVIS	129
B-HH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYLCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	6
B-HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYAFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	8
B-HH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMS WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	10

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO
B-HH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYAFSYSWIN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGGLTLTVSS	12
B-HH7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYAFSYSWIS WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGGLTLTVSS	14
B-HH8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGGLTLTVSS	16
B-HH9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSYSWMN WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGGLTLTVSS	18
B-HL1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTYSWMH WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY WL VYWGQGGLTLTVSS	20
B-HL2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKI SCKVSGYTFTYSWMH WVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYAEKFQGRVTI TADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYWL VYWGQGGLTLTVSS	22
B-HL3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKI SCKVSGYTFTYSWMN WVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYWL VYWGQGGLTLTVSS	24

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO
B-HL4	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYSWMS WVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYAKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	26
B-HL8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	28
B-HL10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMN WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	30
B-HL11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	32
B-HL12	EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	34
B-HL13	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	36
B-HL14	EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	38

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO
B-HL15	EVQLVESGGGLVKGSSRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	40
B-HL16	EVQLVESGGGLVKGSSRLRVSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	42
B-HL17	EVQLVESGGGLVKGSSRLSCAASGFTFSYSWMN WVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	44
Seqüência de Sinal VH	MDWTWRILFLVAAATGAHS	46
B-KV1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYL YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGG TKVE IKRTV	48
B-KV10	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYL YWYLQKAGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGG TKVE IKRTV	130
B-KV11	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYL YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEPEDVGVYYCAQNLELPYTFGGG TKVE IKRTV	131
B-KV12	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYL YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDFGVYYCAQNLELPYTFGGG TKVE IKRTV	132

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO
B-KV13	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYL YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKVA IKRTV	133
B-KV14	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSNGITYL YWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKVE AKRTV	134
Seqüência de Sinal VL	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARC	50

Tabela 4

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO.
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCT GGTTTCACATTCACTGACTACAAGATACACTGGGTGCG ACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGATATT TCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACAGAAG TTCCAGGGCAGGGTCACCATTACCGCGGACAAATCCAC GAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAG GCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACC ACCGTGACCGTCTCCTCA	51
M-HHA	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCAA GCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTCCG GATTCACATTTAGCAACTATTGGATGAACTGGGTGCGGC AGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGGAGAGATC AGATTGAAATCCAATAACTTCGGAAGATATTACGCTGCAA GCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGATGATTCC AAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAGACC GAGGATACGGCCGTGTATTACTGTACCACATACGGCAAC TACGTTGGGCACTACTTCGACCACTGGGGCCAAGGGAC	53

Estrutura	Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO.
	CACCGTCACCGTCTCCAGT	

Tabela 5

Estrutura	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO.
I-HHD	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVV RQAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLSPGGYYVMDAWG QGTTVTVSS	52
M-HHA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVR QAPGKGLEWVGEIRLKSNNFGRYAASVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDVAVYYCTTYGNYVGHYFDHWGQG TTVTVSS	54

[000178] Em outra modalidade particular, a presente invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido derivada de uma seqüência precursora mostrada na figura 1 e Tabela 6 e compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em pelo menos uma região de FR de cadeia pesada. Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido derivada de uma seqüência precursora mostrada na figura 1 e Tabela 6 e compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em pelo menos uma região FR de cadeia pesada.

Tabela 6

Seqüência Nome	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO.
1F5-VH	QVQLRQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSHYGSNYVDYFDYWG QGTLVTVST	55



Seqüência Nome	Seqüência de Aminoácido	SEQ ID NO.
B9E9-VH	QVQLVQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGGGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARAQLRPNYWYFDVWG AGTTVTVS	56
C2B8-VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWG AGTTVTVSA	57
2H7-VH	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVVYYSNSYWYFDVWG TGTTVTVS	58
B-ly1-VH	EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSYSWMNWV KLRPGQGLEWIGRIFPGDGD TDYNGKFKGKATLTADKS SNTAYMQLTSLTSDSAVYLCARNVFDGYWLVYWG QGTLVTVSA	59
2F2-VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWV RQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNK KSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWG QGTTVTVSS	60
7D8-VH	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHWV RQAPGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWG QGTTVTVSS	61
11B8-VH	EVQLVQSGGGLVHPGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWV RQAPGKGLEWVSIIGTGGVTYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYG MDVWGQGTTVTVSS	62

[000179] Em um aspecto, as ABMs modificadas da presente invenção podem compreender uma substituição de uma região de "framework" inteira comparado com a ABM precursora. Assim, por exemplo, a presente invenção é ainda dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo tendo pelo menos uma FR de cadeia pesada derivada de uma

seqüência VH de linhagem germinativa humana. Em uma modalidade preferida, a seqüência de linhagem germinativa VH humana na região FR1 ou nas posições 8-13 de Kabat é derivada de qualquer uma das seqüências identificadas na Tabela 7 abaixo. Essas seqüências estão disponíveis do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr:8104/textes/IMGTrepertoire>) e cada seqüência conforme identificado por seu número de acesso é expressamente incorporada aqui por referência em sua totalidade.

Tabela 7

Nome no banco de dados IMGT	Número de acesso	SEQ ID NO (seqüência de nucleotídeo)
IMGT_hVH_1_2	X07448	82
IMGT_hVH_2_5	X62111	83
IMGT_hVH_2_26	M99648	84
IMGT_hVH_2_70	L21969	85
IMGT_hVH_3_7	M99649	86
IMGT_hVH_3_11	M99652	87
IMGT_hVH_3_19	M99656	88
IMGT_hVH_3_20	M99657	89
IMGT_hVH_3_33	L06618	90
IMGT_hVH_3_43	M99672	91
IMGT_hVH_3_53	M99679	92
IMGT_hVH_3_d	Z18898	93
IMGT_hVH_4_4	X05713	94
IMGT_hVH_4_30_2	L10089	95
IMGT_hVH_4_34	X92278	96
IMGT_hVH_5_51	M99686	97

Nome no banco de dados IMGT	Número de acesso	SEQ ID NO (seqüência de nucleotídeo)
IMGT_hvH_6_1	X92224	98
IMGT_hvH_7_4_1	L10057	99
IMGT_hvH_7_81	Z27509	100

[000180] Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido nas posições 8 a 13 de Kabat da região variável de cadeia pesada ou qualquer subconjunto das mesmas (por exemplo, posições 9 a 12, posições 10-12, etc.) de acordo com qualquer uma das seqüências apresentadas na Tabela 8 abaixo. Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido nas posições 8 a 13 de Kabat ou qualquer subconjunto das mesmas (por exemplo, posições 9 a 12, 10 a 12, etc.) de acordo com qualquer uma das seqüências apresentadas na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8

Seqüência de aminoácido	SEQ ID NO
GAEVKK	63
GPTLVK	64
GPVLVK	65
GPALVK	66
GGGLVQ	67
GGGLVK	68
GGGLVE	69
GGGVVR	70
GGGVVQ	71
GGVVVQ	72
GGGLIQ	73
RGVLVQ	74

Seqüência de aminoácido	SEQ ID NO
GPGLVK	75
GSGLVK	76
GAGLLK	77
GSELKK	78
GHEVKQ	79
GAELKK	101
GAEVVK	102
GGEVKK	103
GAGVKK	104
GGGVVK	105

[000181] Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido nas posições 108 a 113 de Kabat da região variável de cadeia pesada ou qualquer subconjunto das mesmas (por exemplo, posições 110 a 112, posições 110 e 112, etc.). Em uma modalidade particular, a seqüência nas posições 108 a 113 é mostrada na Tabela 9 abaixo. Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um polipeptídeo isolado compreendendo uma seqüência de aminoácido nas posições 108 a 113 de Kabat ou qualquer subconjunto das mesmas (por exemplo, posições 110 a 112, posições 110 e 112, etc.) de acordo com qualquer uma das seqüências apresentadas na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9

Seqüência de aminoácido	SEQ ID NO
LTVVSS	106
LVIVSS	107
LTVVIS	108
LVIVIS	109
LVGVSS	110
LTVVGS	111
LVGVGS	112
LVAVSS	113

Seqüência de aminoácido	SEQ ID NO
LVTVAS	114
LVAVAS	115
LVVVSS	116
LVTVVS	117
LVVVVS	118
LVLVSS	119
LVTVLS	120
LVLVLS	121
LVSVSS	122
LVTVTS	123

[000182] Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a um vetor de expressão e/ou uma célula hospedeira a qual compreende um ou mais polinucleotídeos isolados da presente invenção.

[000183] Geralmente, qualquer tipo de linhagem de célula cultivada pode ser usada para expressar as ABMs da presente invenção. Em uma modalidade preferida, células CHO, células BHK, células HEK293-EBNA, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 e células de hibridoma, células de levedo, células de inseto ou células de planta são usadas como a linhagem de célula de base para gerar as células hospedeiras manipuladas da invenção.

#### ABMs Modificadas Ainda Compreendendo Regiões Fc e Variantes de Região Fc

[000184] Em uma modalidade, as ABMs da presente invenção compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido nas regiões V e/ou CH1 de cadeia pesada e/ou nas regiões V e/ou C de cadeia leve podem ainda compreender uma região Fc humana. Em uma modalidade específica, a região constante humana é IgG1, conforme apresentado em SEQ ID NOs: 80 e 81 e apresentado abaixo:

#### **Seqüência de nucleotídeo de IgG1 (SEQ ID NO: 80)**

ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG  
CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT

ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTG  
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG  
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT  
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA  
CACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAAC  
TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC  
CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGA  
TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC  
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT  
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA  
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG  
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA  
GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG  
ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA  
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT  
CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA  
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  
CCGGGTAAATGA

**Seqüência de aminoácido de IgG1 (SEQ ID NO: 81)**

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

[000185] Contudo, variantes e isoformas da região Fc humana também são abrangidas pela presente invenção. Por exemplo, regiões Fc variantes adequadas para uso na presente invenção podem ser produzidas de acordo com os métodos ensinados na Pat. U.S. No. 6.737.056 para Presta (variantes de região Fc com função efetuidora alterada em virtude de uma ou mais modificações de aminoácido); ou nos Pedidos de Pat. U.S. Nos. 60/439.498; 60/456.041; 60/514.549; ou WO 2004/063351 (regiões Fc variantes com afinidade de ligação aumentada em virtude de modificação de aminoácido); ou no Pedido de Pat. U.S. No. 10/672.280 ou WO 2004/099249 (variantes de Fc com ligação alterada ao Fc $\gamma$ R em virtude de modificação de aminoácido), os conteúdos de cada um dos quais são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

[000186] Em outro aspecto da invenção, as ABMs compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido nas regiões V e/ou CH1 de cadeia pesada e/ou nas regiões V e/ou C de cadeia leve podem ainda compreender uma variante de região Fc. Pode-se manipular uma região Fc para produzir uma variante com afinidade de ligação alterada por um ou mais FcRs. Pode-se, por exemplo, modificar um ou mais resíduos de aminoácido da região Fc de forma a alterar (por exemplo, aumentar ou diminuir) a ligação a um FcR, conforme descrito no Pedido de Pat. Provisório No. 60/678.776, aqui incorporado por referência em sua totalidade. Geralmente, se fará uma substituição de aminoácido em um ou mais dos resíduos da região Fc identificados como afetando a ligação ao FcR de forma a gerar tal variante de região Fc. Em modalidades preferidas, não mais do que cerca de dez resíduos da região Fc serão deletados ou substituídos. As regiões Fc aqui compreendendo uma ou mais modificações de aminoácido (por exemplo, substituições) reterão, de preferência, pelo menos cerca de 80% e de preferência pelo menos cerca de 90% e, mais

preferivelmente, pelo menos cerca de 95% da seqüência de região Fc precursora ou de uma região Fc humana de seqüência nativa.

[000187] Pode-se também fazer regiões Fc modificadas por inserção de aminoácido, variantes as quais têm função efetuada alterada. Por exemplo, pode-se introduzir pelo menos um resíduo de aminoácido (por exemplo, um a dois resíduos de aminoácido e geralmente não mais do que dez resíduos) adjacentes a uma ou mais das posições da região Fc identificadas aqui como tendo um impacto sobre a ligação ao FcR. Por adjacente entenda-se dentro de um a dois resíduos de aminoácido de um resíduo de região Fc identificado aqui. Tais variantes de região Fc podem mostrar ligação ao FcR e/ou função efetuada intensificada ou diminuída. De forma a gerar tais variantes com inserção, pode-se avaliar uma estrutura de co-cristal de um polipeptídeo compreendendo uma região de ligação de um FcR (por exemplo, o domínio extracelular do FcR de interesse) e a região Fc na qual o(s) resíduo(s) de aminoácido tem(têm) de ser inserido(s) (vide, por exemplo, Sondermann e outros, *Nature* 406: 267 (2000); Deisenhofer, *Biochemistry* 20 (9): 2361-2370 (1981); e Burmeister e outros, *Nature* 344: 379-383, (1994), todos os quais são aqui incorporados por referência) de forma a projetar racionalmente uma região Fc modificada que exhibe, por exemplo, capacidade aperfeiçoada de ligação ao FcR.

[000188] Através de introdução das modificações de seqüência de aminoácido apropriadas em uma região Fc precursora, pode-se gerar uma região Fc variante a qual (a) media uma ou mais funções efetuidoras na presença de células efetuidoras humanas mais ou menos eficazmente e/ou (b) a qual se liga a um receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) ou ao receptor Fc neonatal (FcRn) com melhor afinidade do que o polipeptídeo precursor. Tais regiões Fc modificadas geralmente compreenderão pelo menos uma modificação de aminoácido na região



Fc.

[000189] Em modalidades preferidas, a região Fc de polipeptídeo precursora é uma região Fc humana, por exemplo, uma região Fc humana nativa de IgG1 (alótipos A e não-A), IgG2, IgG3, IgG4 humana e todos os alótipos conhecidos ou descobertos de qualquer espécie. Tais regiões têm seqüências tais como aquelas divulgadas no Pedido de Patente U.S. Provisório No. 60/678.776, o qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[000190] Em determinadas modalidades, de forma a gerar uma ABM compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido nas regiões V e/ou CH1 de cadeia pesada e/ou regiões V e/ou C de cadeia leve e ainda compreendendo uma região Fc modificada com função efetuada aperfeiçoada (por exemplo, ADCC), o polipeptídeo precursor tem, de preferência, atividade de ADCC preexistente (por exemplo, o polipeptídeo precursor compreende uma região Fc de IgG1 ou IgG3 humana). Em algumas modalidades, uma região Fc com ADCC aperfeiçoada media a ADCC de modo substancialmente mais eficaz do que um anticorpo com uma região Fc de IgG1 ou IgG3 nativa.

[000191] Em modalidades particulares, modificação(ões) de aminoácido é(são) introduzida(s) no domínio CH2 da região Fc precursora.

[000192] Os polipeptídeos da invenção tendo regiões Fc modificadas podem ser submetidos a uma ou mais de tais modificações, dependendo do uso desejado ou pretendido do polipeptídeo. Tais modificações podem envolver, por exemplo, alteração adicional da seqüência de aminoácido (substituição, inserção e/ou deleção de resíduos de aminoácido), fusão a polipeptídeo(s) heterólogo(s) e/ou modificações covalentes. Essas outras modificações podem ser feitas antes de, simultaneamente com ou após a(s) modificação(ões) de

aminoácido divulgada(s) acima, as quais resultam em uma alteração na ligação ao receptor Fc e/ou função efetuada.

[000193] Alternativa ou adicionalmente, pode ser útil combinar modificações de aminoácido com uma ou mais de outras modificações de aminoácido que alteram a ligação a C1q e/ou função de citotoxicidade complemento-dependente da região Fc. O polipeptídeo de iniciação de interesse particular a esse respeito aqui é um que se liga ao C1q e mostra citotoxicidade complemento-dependente (CDC). Substituições de aminoácido descritas aqui podem servir para alterar a capacidade do polipeptídeo de iniciação de se ligar ao C1q e/ou modificar sua função de citotoxicidade complemento-dependente (por exemplo, para reduzir e, de preferência, eliminar essas funções efetadoras). Contudo, polipeptídeos compreendendo substituições em uma ou mais das posições descritas com ligação a C1q e/ou função de citotoxicidade complemento-dependente (CDC) aperfeiçoada são considerados aqui. Por exemplo, o polipeptídeo de iniciação pode ser incapaz de se ligar ao C1q e/ou mediar a CDC e pode ser modificado de acordo com os ensinamentos aqui de modo que ele adquira essas outras funções efetadoras. Além disso, polipeptídeos com atividade de ligação a C1q preexistente, opcionalmente ainda tendo a capacidade de mediar a CDC, podem ser modificados de modo que uma ou ambas dessas atividades sejam intensificadas. Modificações de aminoácido que alteram o C1q e/ou modificam sua função de citotoxicidade complemento-dependente são descritos, por exemplo, no WO00/42072, o qual é incorporado aqui por referência.

[000194] Conforme descrito acima, pode-se projetar uma região Fc ou porção da mesma com função efetuada alterada, por exemplo, através de modificação da ligação ao C1q e/ou ligação ao FcR e, desse modo, alterar a atividade de CDC e/ou atividade de ADCC. Por

exemplo, pode-se gerar uma região Fc modificada com ligação aperfeiçoada ao C1q e ligação aperfeiçoada ao FC $\gamma$ RIII (por exemplo, tendo atividade de ADCC e atividade de CDC aperfeiçoadas). Alternativamente, onde se deseja que a função efetuidora seja reduzida ou eliminada, pode-se manipular uma região Fc modificada com atividade de CDC reduzida e/ou atividade de ADCC reduzida. Em outras modalidades, pode-se aumentar apenas uma dessas atividades e opcionalmente também reduzir a outra atividade, por exemplo, para gerar uma região Fc modificada com atividade de ADCC aperfeiçoada, mas atividade de CDC reduzida e vice-versa.

[000195] Outro tipo de substituição de aminoácido serve para alterar o padrão de glicosilação do polipeptídeo. Isso pode ser obtido, por exemplo, através de deleção de uma ou mais porções de carboidrato encontradas no polipeptídeo e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no polipeptídeo. Glicosilação de polipeptídeos é, tipicamente, N-ligada ou O-ligada. N-ligada se refere à fixação da porção carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As seqüências peptídicas asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as seqüências de reconhecimento para fixação enzimática da porção carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas seqüências peptídicas em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação em potencial. Glicosilação O-ligada se refere à fixação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidróxi-aminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidróxiprolina ou 5-hidróxilisina também possam ser usadas.

[000196] Em algumas modalidades, a presente invenção proporciona composições compreendendo uma modificação de um polipeptídeo precursor tendo uma região Fc, em que a região Fc modificada

compreende pelo menos uma modificação de resíduo de aminoácido na superfície (vide, por exemplo, Deisenhofer, *Biochemistry*, 28; 20(9): 2361-70, Abril de 1981 e WO00/42072, ambos os quais são aqui incorporados por referência). Em outras modalidades, a presente invenção proporciona composições compreendendo uma modificação do polipeptídeo precursor tendo uma região Fc, em que a região Fc modificada compreende pelo menos uma modificação de resíduo de aminoácido não na superfície. Em outras modalidades, a presente invenção compreende uma variante de um polipeptídeo precursor tendo uma região Fc, em que a variante compreende pelo menos uma modificação de aminoácido na superfície e pelo menos uma modificação de aminoácido não na superfície.

[000197] A eficácia terapêutica das ABMs modificadas da presente invenção pode ser ainda intensificada através de produção das mesmas em uma célula hospedeira que tenha sido glico-manipulada para ter expressão alterada de pelo menos uma glicosiltransferase de modificação de glicoproteína. Em uma modalidade, a célula hospedeira glico-manipulada ainda expressa um ou mais dos seguintes: um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de ManII ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GalT. Em uma modalidade preferida, a célula hospedeira expressa um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII ou atividade de ManII. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira expressa um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII, bem como um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de ManII. Em ainda outra modalidade preferida, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo

residente no Golgi. Em outra modalidade preferida, a expressão das ABMs modificadas da presente invenção em uma célula hospedeira que expressa um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII resulta em ABMs modificadas com afinidade de ligação aumentada pelo receptor Fc e função efetuada aumentada. Conseqüentemente, em uma modalidade, a presente invenção é dirigida a uma célula hospedeira compreendendo (a) um ácido nucléico isolado compreendendo uma seqüência que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII; e (b) um polinucleotídeo isolado que codifica uma ABM da presente invenção, tal como um anticorpo quimérico, primatizado ou humanizado que se liga ao CD20 humano. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio catalítico de GnTIII e o domínio de localização no Golgi é o domínio de localização de manosidase II. Métodos para geração de tais polipeptídeos de fusão e uso dos mesmos para produzir anticorpos com funções efetuidoras aumentadas são descritos no Pedido de Patente U.S. Provisório No. 60/495.142 e Pub. de Pedido de Pat. U.S. No.2004/0241817, os conteúdos todos de cada um dos quais são aqui expressamente incorporados por referência. Em outra modalidade preferida, a ABM quimérica é um anticorpo quimérico ou um fragmento do mesmo tendo a especificidade de ligação do anticorpo B-ly1 de murino. Em uma modalidade particularmente preferida, o anticorpo quimérico compreende uma Fc humana. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é primatizado ou humanizado.

[000198] Em uma modalidade, um ou mais polinucleotídeos que codificam uma ABM da presente invenção podem ser expressos sob o controle de um promotor constitutivo ou, alternativamente, um sistema de expressão regulado. Sistemas de expressão regulados adequados incluem, mas não estão limitados a, um sistema de expressão

tetraciclina-regulado, um sistema de expressão ecdisona-induzível, um sistema de expressão lac-comutado, um sistema de expressão glicocorticóide-induzível, um sistema promotor temperatura-induzível e um sistema de expressão metal de metalotioneína-induzível. Se vários ácidos nucleicos diferentes que codificam uma ABM da presente invenção são compreendidos dentro do sistema da célula hospedeira, alguns deles podem ser expressos sob o controle de um promotor constitutivo, enquanto que outros são expressos sob o controle de um promotor regulado. O nível máximo de expressão é considerado como sendo o maior nível possível de expressão estável de polipeptídeo que não tem um efeito adverso significativo sobre a taxa de crescimento celular e será determinado usando experimentação de rotina. Níveis de expressão são determinados através de métodos geralmente conhecidos na técnica, incluindo análise de Western blot usando um anticorpo específico para a ABM ou um anticorpo específico para uma tag peptídica fundida à ABM; e análise de Northern blot. Em uma outra alternativa, o polinucleotídeo pode ser operativamente ligado a um gene repórter; os níveis de expressão de uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor são determinados através de medição de um sinal correlacionado com o nível de expressão do gene repórter. O gene repórter pode ser transcrito junto com o(s) ácido(s) nucléico(s) que codifica(m) os referidos polipeptídeos de fusão que uma única molécula de mRNA; suas respectivas seqüências de codificação podem ser ligadas através de um sítio de entrada ribossômica interno (IRES) ou por um intensificador de tradução revestimento-independente (CITE). O gene repórter pode ser traduzido junto com pelo menos um ácido nucléico que codifica uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor, de modo que uma única cadeia polipeptídica seja

formada. Os ácidos nucleicos que codificam as ABMs da presente invenção podem ser operativamente ligados ao gene repórter sob o controle de um único promotor, de modo que o ácido nucléico que codifica o polipeptídeo de fusão e o gene repórter sejam transcritos em uma molécula de RNA a qual é, alternativamente, unida em duas moléculas de RNA mensageiro (mRNA) distintas; um dos mRNAs resultantes é traduzido na referida proteína repórter e o outro é traduzido no referido polipeptídeo de fusão.

#### Expressão de ABMs Modificadas

[000199] Métodos os quais são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo a seqüência de codificação de uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor junto com sinais de controle de transcrição/tradução apropriados. Esses métodos incluem técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação *in vivo*/recombinação genética. Vide, por exemplo, as técnicas descritas em Maniatis e outros, MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989) e Ausubel e outros, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).

[000200] Uma variedade de sistemas de vetor de expressão-hospedeiro pode ser utilizada para expressar a seqüência de codificação das ABMs da presente invenção. De preferência, células de mamífero são usadas como sistemas de célula hospedeira transfectados com DNA de plasmídeo recombinante ou vetores de expressão de DNA recombinante contendo a seqüência de codificação da proteína de interesse e a seqüência de codificação do polipeptídeo de fusão. Mais preferivelmente, células CHO, células HEK293-EBNA, célula BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO,

células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 ou células de hibridoma, outras células de mamífero, células de levedo, células de inseto ou células de planta são usadas como um sistema de célula hospedeira. Alguns exemplos de sistemas de expressão e métodos de seleção são descritos nas referências a seguir e referências nas mesmas: Borth e outros, *Biotechnol. Bioen.* 71(4): 266-73 (2000-2001), em Werner e outros, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8): 870-80 (1998), em Andersen e Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), em Chadd e Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001) e em Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). Em modalidades alternativas, outros sistemas de célula eucariota podem ser considerados, incluindo células de levedo transformadas com vetores de expressão de levedo recombinante contendo a seqüência de codificação de uma ABM da presente invenção, tal como os sistemas de expressão ensinados no Pedido de Pat. U.S. Nº 60/344.169 e WO 03/056914 (métodos para a produção de glicoproteína semelhante à humana em uma célula hospedeira eucariota não-humana) (os conteúdos de cada um dos quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade); sistemas de células de inseto com vetores de expressão virais recombinantes (por exemplo, báculo vírus) contendo a seqüência de codificação de uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor; sistemas de célula de planta infectados com vetores de expressão virais recombinantes (por exemplo, vírus mosaico da couve-flor, CaMV; vírus mosaico de tabaco, TMV) ou vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo a seqüência de codificação da ABM da invenção incluindo, mas não limitado a, os sistemas de expressão ensinados na Pat. U.S. Nº 6.815.184 (métodos para expressão e secreção de polipeptídeos



biologicamente ativos a partir de duckweed geneticamente manipulada); WO 2004/057002 (produção de proteínas glicosiladas em células de planta briófitas através de introdução de um gene de glicosil transferase) e WO 2004/024927 (métodos de geração de proteína não vegetal heteróloga extracelular em protoplasta de musgo); e Pedidos de Pat. U.S. N<sup>os</sup> 60/365.769, 60/368.047 e WO 2003/078614 (processamento de glicoproteína em plantas transgênicas compreendendo uma enzima GnTIII funcional em mamífero) (os conteúdos de cada um dos quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade); ou sistemas de células animais infectadas com vetores de expressão viral recombinantes (por exemplo, adenovírus, vírus da varíola) incluindo linhagens de células manipuladas para conter múltiplas cópias do DNA que codifica uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor estavelmente amplificado (CHO/dhfr) ou estavelmente amplificado em cromossomas duplamente diminutos (por exemplo, linhagens de células de murino). Em uma modalidade, o vetor compreendendo o(s) polinucleotídeo(s) que codifica a ABM da invenção é policistrônico. Também, em uma modalidade, a ABM discutida acima é um anticorpo ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade preferida, a ABM é anticorpo humanizado.

[000201] Para os métodos da presente invenção, expressão estável geralmente é preferida à expressão transitória porque ela obtém, tipicamente, resultados mais reproduzíveis e também é mais passível de produção em larga escala. Em vez de usar vetores de expressão os quais contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com os respectivos ácidos nucleicos de codificação controlados por elementos de controle de expressão apropriados (por exemplo, promotor, intensificador, seqüências,

terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.) e um marcador selecionável. Após a introdução de DNA estranho, células manipuladas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias em meio enriquecido e, então, trocado por um meio seletivo. Um marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite a seleção de células as quais têm estavelmente integrado o plasmídeo em seus cromossomos e crescem para formar focos os quais, por sua vez, podem ser clonados e expandidos em linhagens de células.

[000202] Uma série de sistemas de seleção pode também ser usada incluindo, mas não limitada a, quinase de timidina de herpes simplex (Wigler e outros, *Cell* 11: 223 (1977)), fosforibosiltransferase de hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026 (1962)) e genes de fosforibosiltransferase de adenina (Lowy e outros, *Cell* 22: 817 (1980)), os genes podem ser empregados em células tk<sup>-</sup>, hgprt<sup>-</sup> ou aprf<sup>-</sup>, respectivamente. Também, resistência anti-metabólito pode ser usada como a base de seleção por genes de dhfr, o qual confere resistência ao metotrexato ((Wigler e outros, *Natl Acad. Sci. USA* 77: 3567 (1989); O'Hare e outros, *Proc. Natl Acad. Sci USA* 78: 1527 (1981)); gpt o qual confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl Acad. Sci USA* 78: 2072 (1981)); neo, o qual confere e semelhantes ao aminoglicosídeo G-418 (Colberre-Garapin e outros, *J. Mol Biol* 150: 1 (1981)); e higo, o qual confere resistência à higromicina (Santerre e outros, *Gene* 30: 147 (1984). Recentemente, genes selecionáveis adicionais foram descritos, isto é, trpB, o qual permite que as células utilizem indola em lugar de triptofano; hisD, o qual permite que as células utilizem histidinol em lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl Acad. Sci USA* S5: 8047 (1988); o sistema de sintase de glutamina; e ODC (decarboxilase de ornitina), o qual confere resistência ao inibidor

decarboxilase de ornitina, , 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DEMO (McConlogue, em: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

### **Expressão de ABMs Modificadas compreendendo Regiões Fc com Glicosilação Alterada**

[000203] Em outro aspecto, a presente invenção é ainda dirigida a um método para modificação do perfil de glicosilação das ABMs modificadas compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido na região V ou CH1 que são produzidas por uma célula hospedeira, compreendendo expressão na referida célula hospedeira de um ácido nucléico que codifica uma ABM modificada da invenção e um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo com atividade de GnTIII ou um vetor compreendendo tais ácidos nucleicos. De preferência, o polipeptídeo modificado é IgG ou um fragmento do mesmo compreendendo a região Fc. Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM é um anticorpo humanizado ou um fragmento do mesmo. Em outra modalidade, a célula hospedeira é manipulada para co-expressar a ABM da invenção, GnTIII e manosidase II (ManII).

[000204] As ABMs modificadas produzidas pelas células hospedeiras da invenção exibem afinidade de ligação ao receptor Fc aumentada e/ou função efetuada aumentada como um resultado da modificação. Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM modificada é um anticorpo humanizado ou um fragmento do mesmo contendo a região Fc. De preferência, a afinidade de ligação pelo receptor Fc é aumentada é ligação aumentada a um receptor de ativação de  $Fc\gamma$ , tal como um receptor,  $Fc\gamma RIIIa$ . A função efetuada aumentada é, de preferência, um aumento em um ou mais dos seguintes: citotoxicidade celular, anticorpo-dependente aumentada, fagocitose celular anticorpo-dependente aumentada (ADCP), secreção

aumentada de citocina, captação de antígeno complexo imunemediada aumentada por células que apresentam antígeno, citotoxicidade celular Fc-mediada, ligação aumentada à células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada à células polimorfonucleares (PMNs), ligação aumentada a monócitos, reticulação aumentada de anticorpos alvo-ligados, sinalização direta que induz à apoptose aumentada, maturação aumentada de células dendríticas e "priming" (iniciação) aumentado de células T.

[000205] Funções efetadoras podem ser medidas e/ou determinadas através de vários ensaios conhecidos por aqueles versados na técnica. Vários ensaios para medir funções efetadoras, incluindo afinidade de ligação ao receptor Fc e citotoxicidade complemento-dependente, são descritos na Publicação de Pedido US Nº 2004/0241817A1, o qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Secreção de citosina pode ser medida, por exemplo, usando um ELISA em sanduíche vide, por exemplo, McRae e outros, *J. Immunol.* 164: 23-28 (2000) e o protocolo de ELISA em sanduíche de citosina disponível em [www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols](http://www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols) ou através dos métodos descritos em Takahashi e outros, *British J. Pharmacol.* 137: 315-322 (2002), cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Maturação de células dendríticas, por exemplo, pode ser determinada usando ensaios conforme apresentado por Kalergis e Ravetch, *J. Exp. Med.* 195: 1653-59 (2002), o qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Exemplos de ensaios de apresentação/captação de antígeno e fagocitose são proporcionados por Gresham e outros, *J. Exp. Med.* 191: 515-28 (2000); Krauss e outros, *J. Immunol* 153: 1769-77 (1994); e Rafiq e outros, *J. Clin. Invest.* 110: 71-79 (2002) e Hamano e outros, *J. Immunol.* 164: 6113-19 (2000), cada um dos quais é aqui incorporado por referência em

sua totalidade. Sub-regulação de receptores na superfície celular pode ser medida, por exemplo, através dos métodos apresentados por Liao e outros, *Blood* 83: 2294-2304 (1994), o qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Métodos gerais, protocolos e ensaios podem ser encontrados em CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK, Celis, J.E., ed., (2ª ed., 1998) o qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Está dentro da capacidade daqueles versados na técnica adaptar os métodos, protocolos e ensaios mencionados acima para uso com a presente invenção.

[000206] A presente invenção é também dirigida a um método para produção de uma ABM da presente invenção, tendo oligossacarídeos modificados em uma célula hospedeira compreendendo (a) cultura de uma célula hospedeira manipulada para expressar pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII sob condições as quais permitem a produção de uma ABM de acordo com a presente invenção, em que o referido polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é expresso em uma quantidade suficiente para modificar os oligossacarídeos na região Fc da referida ABM produzida pela referida célula hospedeira; e (b) isolamento da referida ABM. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio catalítico de GnTIII. Em uma modalidade particularmente preferida, o polipeptídeo de fusão ainda compreende o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi.

[000207] De preferência, o domínio de localização no Golgi é o domínio de localização de manosidase II ou GnTI. Alternativamente, o domínio de localização no Golgi é selecionado do grupo consistindo em: o domínio de localização de manosidase I, o domínio de localização de GnTII e o domínio de localização de uma fucosiltransferase com núcleo de  $\alpha$ -1,6. As ABMs produzidas através

dos métodos da presente invenção têm afinidade de ligação pelo receptor Fc é aumentada é ligação aumentada a um receptor de ativação de Fc $\gamma$ , tal como um receptor, Fc $\gamma$ RIIIa. A função efetuada aumentada é, de preferência, um aumento em um ou mais dos seguintes: citotoxicidade celular, anticorpo-dependente aumentada, fagocitose celular anticorpo-dependente aumentada (ADCP), secreção aumentada de citocina, captação de antígeno complexo imunemediada aumentada por células que apresentam antígeno, citotoxicidade celular Fc-mediada, ligação aumentada à células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada à células polimorfonucleares (PMNs), ligação aumentada a monócitos, reticulação aumentada de anticorpos alvo-ligados, sinalização direta que induz à apoptose aumentada, maturação aumentada de células dendríticas e iniciação aumentado de células T. A afinidade de ligação aumentada ao receptor Fc é, de preferência, ligação aumentada a receptores de ativação Fc, tal como Fc $\gamma$ RIIIa. Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM é um anticorpo humanizado ou um fragmento do mesmo.

[000208] Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor produzido através dos métodos da invenção o qual tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos bisseccionados na região Fc do referido polipeptídeo. Considera-se que tal ABM compreende anticorpos e fragmentos dos mesmos compreendendo a região Fc. Em uma modalidade preferida, a ABM é um anticorpo humanizado. Em uma modalidade, o percentual de oligossacarídeos bisseccionados na região Fc da ABM é pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% e, mais preferivelmente, pelo menos 90-95% dos oligossacarídeos totais. Em ainda outra modalidade, a

ABM produzida através dos métodos da invenção tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos não fucosilados na região Fc como um resultado da modificação de seus oligossacarídeos através dos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, o percentual de oligossacarídeos não fucosilados é pelo menos 50%, de preferência pelo menos 60% a 70%, mais preferivelmente 75%. Os oligossacarídeos não fucosilados podem ser do tipo híbrido ou complexo. Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM produzida pelas células hospedeiras e métodos da invenção têm uma proporção aumentada de oligossacarídeos não fucosilados bisseccionados na região Fc. Os oligossacarídeo não fucosilados bisseccionados podem ser híbridos ou complexos. Especificamente, os métodos da presente invenção podem ser usados para produzir ABMs nas quais pelo menos 15%, mais preferivelmente pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 35% dos oligossacarídeos na região Fc da ABM são bisseccionados não fucosilados. Os métodos da presente invenção também podem ser usados para produzir polipeptídeos nos quais pelo menos 15%, mais preferivelmente pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 35% dos oligossacarídeos na região Fc do polipeptídeo são bisseccionados não fucosilados.

[000209] Em outra modalidade, a presente invenção é dirigida a uma ABM modificada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação de um anticorpo precursor manipulado para ter função efetuada aumentada e/ou afinidade de ligação aumentada ao receptor Fc, produzida através dos métodos da invenção. De preferência, a função efetuada aumentada é um ou mais dos seguintes: citotoxicidade celular, anticorpo-dependente aumentada,

fagocitose celular anticorpo-dependente aumentada (ADCP), secreção aumentada de citocina, captação de antígeno complexo imunemediada aumentada por células que apresentam antígeno, citotoxicidade celular Fc-mediada, ligação aumentada à células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada à células polimorfonucleares (PMNs), ligação aumentada a monócitos, reticulação aumentada de anticorpos alvo-ligados, sinalização direta que induz à apoptose aumentada, maturação aumentada de células dendríticas e iniciação aumentado de células T. Em uma modalidade preferida, a afinidade de ligação aumentada ao receptor Fc é ligação aumentada a um receptor de ativação Fc, mais preferivelmente  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ . Em uma modalidade, a ABM modificada é um anticorpo, um fragmento de anticorpo contendo a região Fc ou uma proteína de fusão que inclui uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina. Em uma molécula particularmente preferida, a ABM é um anticorpo humanizado.

#### Composições farmacêuticas compreendendo as ABMs modificadas

[000210] A presente invenção é dirigida ainda à composições farmacêuticas compreendendo as ABMs modificadas da presente invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[000211] Qualquer material veículo convencional pode ser utilizado. O material veículo pode ser orgânico ou inorgânico adequado para administração eteral, percutânea ou parenteral. Veículos adequados incluem, água, gelatina, goma arábica, lactose, amido, estearato de magnésio, talco, óleos vegetais, polialquilenos glicólicos, geléia de petróleo e semelhantes. Além disso, os preparados farmacêuticos podem conter outros agentes farmacêuticamente aceitáveis. Aditivos adicionais, tais como agente de flavorização, estabilizantes, agentes de emulsificação, tampões e semelhantes podem ser adicionados de acordo com as práticas aceitas de composição farmacêutica.



[000212] A frase “farmaceuticamente aceitável” é empregada aqui para se referir àqueles compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem os quais são, dentro do escopo do julgamento médico, adequados para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade, irritação, resposta alérgica excessiva ou outro problema ou complicação, comensurável com uma proporção benefício/risco razoável.

[000213] A presente invenção é ainda dirigida a tais composições farmacêuticas para uso no tratamento ou profilaxia de câncer. A presente invenção é ainda dirigida a um método de tratamento ou profilaxia de câncer compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica da presente invenção.

[000214] De preferência, o câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de rim e câncer de cérebro.

[000215] A presente invenção é ainda dirigida a tais composições farmacêuticas para uso no tratamento ou profilaxia de uma condição ou lesão pré-cancerígena. A presente invenção é ainda dirigida a um método para o tratamento ou profilaxia de uma condição ou lesão pré-cancerígena compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica da invenção.

[000216] De preferência, a condição ou lesão pré-cancerígena é selecionada do grupo consistindo em leucoplasia oral, queratose actínica (queratose solar), pólipos pré-cancerígenos do cólon ou reto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de câncer de cólon de não-polipose hereditária (HNPCC), esôfago de Barrett, displasia de bexiga e condições cervicais pré-cancerígenas.

[000217] A presente invenção ainda proporciona métodos para a geração e uso de sistemas de célula hospedeira para a produção de glicoformas das ABMs modificadas da presente invenção, tendo afinidade de ligação aumentada ao receptor Fc, de preferência ligação aumentada a receptores de ativação Fc e/ou tendo funções efetadoras aumentadas, incluindo citotoxicidade celular anticorpo-dependente. A metodologia de glico-manipulação que pode ser usada com as ABMs modificadas da presente invenção foi descrita em maiores detalhes na Patente U.S. Nº 6.602.684 e Pedido de Patente U.S. Provisório No. 60/441.307 e WO 2004/065540, os conteúdos totais de cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade. As ABMs modificadas da presente invenção podem, alternativamente, ser glico-manipuladas para ter resíduos de fucose reduzidos na região Fc de acordo com as técnicas divulgadas no EP 1 176 195 A1, os conteúdos totais do qual é aqui incorporado por referência.

Geração de Linhagens de Célula para Produção de ABMs Modificadas com Padrão de Glicosilação Alterada

[000218] A presente invenção proporciona sistemas de expressão de célula hospedeira para a geração das ABMs modificadas da presente invenção tendo padrões de glicosilação modificados. Em particular, a presente invenção proporciona sistemas de célula hospedeira para geração de glicoformas das ABMs modificadas da presente invenção tendo um valor terapêutico aperfeiçoado. Portanto, a invenção proporciona sistemas de expressão de célula hospedeira selecionados ou manipulados para expressar um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII. Em uma modalidade, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi heterólogo.

[000219] Especificamente, tais sistemas de expressão de célula

hospedeira podem ser manipulados para compreender uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII, operativamente ligado a um sistema promotor constitutivo ou regulado.

[000220] Em uma modalidade específica, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira que foi manipulada para expressar pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo de fusão tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi heterólogo. Em uma aspecto, a célula hospedeira é manipulada com uma molécula de ácido nucléico compreendendo pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo de fusão tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi heterólogo.

[000221] Em geral, qualquer tipo de linhagem de célula cultivada, incluindo as linhagens de célula discutidas acima, pode ser usado como uma base para manipular as linhagens de célula hospedeira da presente invenção. Em uma modalidade preferida, células CHO, células HEK293-EBNA, célula BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 ou células de hibridoma, outras células de mamífero, células de levedo, células de inseto ou células de planta são usadas como a linhagem de célula de base para gerar as células hospedeiras manipuladas da invenção.

[000222] A invenção é considerada como abrangendo quaisquer células hospedeiras manipuladas expressando um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII, incluindo um polipeptídeo de fusão que compreende o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi heterólogo conforme definido aqui.

[000223] Um ou vários ácidos nucleicos que codificam um

polipeptídeo tendo atividade de GnTIII podem ser expressos sob o controle de um promotor constitutivo ou, alternativamente, um sistema de expressão regulado. Tais sistemas são bem-conhecidos na técnica e incluem os sistemas descritos acima. Se vários diferentes ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos de fusão tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização no Golgi de um polipeptídeo residente no Golgi heterólogo são compreendidos dentro do sistema de célula hospedeira, alguns deles podem ser expressos sob o controle de um promotor constitutivo, enquanto que outros são expressos sob o controle de um promotor regulado. Níveis de expressão dos polipeptídeos de fusão tendo atividade de GnTIII são determinados através de métodos geralmente conhecidos na técnica, incluindo análise de Western blot, análise de Northern blot, análise de expressão de gene repórter ou medição de atividade de GnTIII. Alternativamente, uma lecitina pode ser empregada a qual se liga a produtos biossintéticos da GnTIII, por exemplo, E<sub>4</sub>-PHA lectina. Alternativamente, um ensaio funcional o qual mede a ligação aumentada ao receptor Fc ou função efetuada aumentada mediada por anticorpos produzidos pelas células manipuladas com o ácido nucléico que codifica um polipeptídeo com atividade de GnTIII pode ser usado.

Identificação de Transfectantes ou Transformantes que expressam a proteína tendo um padrão de glicosilação modificado

[000224] As células hospedeiras as quais contêm a seqüência de codificação de uma ABM modificada da presente invenção e as quais expressam os produtos genéticos biologicamente ativos podem ser identificadas através de pelo menos quatro abordagens gerais: (a) hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA; (b) a presença ou ausência de funções de gene “marcador”; (c) avaliação do nível de transcrição, conforme medido pela expressão dos respectivos transcritos de mRNA

na célula hospedeira; e (d) detecção do produto genético conforme medido através de um imunoensaio ou através de sua atividade biológica.

[000225] Na primeira abordagem, a presença da seqüência de codificação de uma ABM modificada da presente invenção e da seqüência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII podem ser detectadas através de hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA usando sondas compreendendo seqüências de nucleotídeo que são homólogas às respectivas seqüências de codificação, respectivamente, ou porções ou derivados das mesmas.

[000226] Na segunda abordagem, o vetor de expressão recombinante/sistema hospedeiro pode ser identificado e selecionado baseado na presença ou ausência de determinadas funções de gene “marcador” (por exemplo, atividade de quinase de timidina, resistência a antibióticos, resistência ao metotrexato, fenotipo de transformação, oclusão de formação de corpo baculovírus, etc.). Por exemplo, se a seqüência de codificação da ABM modificada da invenção ou um fragmento da mesma e a seqüência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII são inseridas dentro de uma seqüência de gene marcador do vetor, recombinantes contendo as respectivas seqüências de codificação podem ser identificados pela ausência da função do gene marcador. Alternativamente, um gene marcador pode ser colocado aleatoriamente com as seqüências de codificação sob o controle do mesmo ou de um promotor diferente usado para controlar a expressão das seqüências de codificação. Expressando o marcador em resposta à indução ou seleção indica expressão da seqüência de codificação da ABM modificada da invenção e da seqüência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII.

[000227] Na terceira abordagem, a atividade transcricional para a região de codificação da ABM modificada da invenção ou um

fragmento da mesma e da sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII pode ser avaliada através de ensaios de hibridização. Por exemplo, RNA pode ser isolado e analisado através de Northern blot usando uma sonda homóloga às sequência de codificação da ABM modificada da invenção ou um fragmento das mesmas e à sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII ou porções particulares da mesma. Alternativamente, os ácidos nucleicos totais da célula hospedeira podem ser extraídos e analisados com relação à hibridização a tais sondas.

[000228] Na quarta abordagem, a expressão dos produtos de proteína pode ser avaliada imunologicamente, por exemplo, através de Western blots, imunoenaios tal como radioimuno-precipitação, imunoenaios enzima-ligados e semelhantes. O teste final do sucesso do sistema de expressão, contudo, envolve a detecção dos produtos genéticos biologicamente ativos.

Geração e uso de ABMs modificadas tendo função efetuada aumentada incluindo citotoxicidade celular anticorpo-dependente

[000229] Em modalidades preferidas, a presente invenção proporciona glicofomas de ABMs modificadas quiméricas tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo B-ly1 de murino e tendo função efetuada aumentada, incluindo citotoxicidade celular anticorpo-dependente. Manipulação de glicosilação de anticorpos foi anteriormente descrita. Vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.602.684, incorporada aqui por referência em sua totalidade.

[000230] Experimentos clínicos de anticorpo monoclonais não conjugados (mAbs) para o tratamento de alguns tipos de câncer têm proporcionando recentemente resultados encorajadores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997); Deo e outros, *Immunology Today* 18: 127 (1997). Uma IgG1 não conjugada

quimérica foi aprovada para linfoma não Hodgkin de célula B folicular ou de baixo grau. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997), enquanto que outro mAb não conjugado, uma IgG1 humanizada que objetiva tumores sólidos de mama, também mostrou resultados promissores em experimentos clínicos na fase III. Deo e outros, *Immunology Today* 18: 127 (1997). Os antígenos desses dois mAbs são altamente expressos em suas respectivas células tumorígenas e os anticorpos mediam destruição potente de tumor por células efetadoras *in vitro* e *in vivo*. Em contraste, muitos outros mAbs não conjugados com especificidades de tumor finas não podem disparar funções efetadoras de potência suficiente para serem clinicamente úteis. Frost e outros, *Cancer* 80: 311'-33 (1997); Surfus e outros, *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996) para alguns desses mAbs mais fracos, terapia adjunta com citosina está sendo atualmente testada. A adição de citosinas pode estimular a citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) aumentando a atividade e o número de linfócitos em circulação. Frost e outros, *Cancer* 80: 317-33 (1997); Surfus e outros, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). A ADCC, um ataque lítico sobre células anticorpo-objetivadas, é disparada quando de ligação de receptores de leucócitos à região constante (Fc) de anticorpos. Deo e outros, *Immunology Today* 18: 127 (1997).

[000231] Uma abordagem diferente, mas complementar, ao aumento de atividade de ADCC de IgG1s não conjugadas é manipular a região Fc do anticorpo. Estudos de manipulação de proteína mostraram que FcγRs interagem com a região de dobradiça inferior do domínio CH2 da IgG. Lund e outros, *J. Immunol* 157: 4963- 69 (1996) . Contudo, a ligação ao FcγR também requer a presença de oligossacarídeos covalentemente presos na Asn297 conservada do domínio da região CH2 Lund e outros, *J. Immunol* 157: 4963- 69 (1996); Wright e Morrison, *Trends Biotech.* 15: 26-31 (1997), sugeriram que o

oligossacarídeos e o polipeptídeo contribuem ambos diretamente para o sítio de interação ou que o oligossacarídeos é requerido para manter uma conformação de polipeptídeo ativo no CH2. Modificação da estrutura do oligossacarídeo pode, portanto, ser explorada como um meio para aumentar a afinidade da interação.

[000232] Uma molécula IgG traz dois oligossacarídeos N-ligados em sua região Fc, um sobre cada cadeia pesada. Como qualquer glicoproteína, um anticorpo é produzido como uma população de glicoformas as quais compartilham a mesma parte principal de polipeptídeo, mas têm diferentes oligossacarídeos presos nos sítios de glicosilação. Os oligossacarídeos normalmente encontrados na região Fc de IgG no soro são do tipo bi-anténario complexo (Wormald e outros, *Biochemistry* 5(5): 130-38 (1997)), com um baixo nível de ácido siálico terminal e N-acetilglicosamina de bi-seção (GlcNAc) e um grau variável de galactosilação terminal e fucosilação de núcleo. Alguns estudos sugerem que a estrutura mínima de carboidrato requerida para ligação ao FcγR repousa dentro do núcleo de oligossacarídeo. Lund e outros, *J. Immunol.* 757: 4963-69 (1996).

[000233] As linhagens de célula derivadas de camundongo ou hamster usadas na indústria e academia para produção de mAbs terapêuticos não conjugados normalmente prendem aos determinantes de oligossacarídeos requeridos aos sítios de Fc. IgGs expressas nessas linhagens de célula carecem, contudo, da GlcNAc de bi-seção encontrada em baixas quantidades em IgGs no soro Lifely e outros, *Glycobiology* 375: 813-22 (1995). O anticorpo derivado de célula de rato atingiu uma atividade máxima de ADCC e viscosidade similar como anticorpos CAMPATH-1H produzidos nas linhagens de célula-padrões, mas em concentrações significativamente menores de anticorpo.

[000234] O antígeno CAMPATH normalmente está presente em altos



níveis sobre células de linfoma e esse mAb quimérico tem alta atividade de ADCC na ausência de uma GlcNAc de bi-secção. Lifely e outros, *Glycobiology* 375: 813-22 (1995) na via de glicosilação N-ligada, uma GlcNAc de bi-secção é adicionada pela GnTIII. . Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 54:163-81 (1986).

[000235] Estudos anteriores usaram uma única linhagem de célula CHO que produz anticorpo, que foi previamente manipulada para expressar, de um modo externamente regulado, diferentes níveis de uma enzima de genes GnTIII clonado (Umana, P., e outros, *Nature Biotechnol.* 77: 176-180 (1999)). Essa abordagem estabeleceu, pela primeira vez, uma correlação rigorosa entre a expressão de GnTIII e a atividade de ADCC do anticorpo modificado. Assim, a invenção considera um anticorpo quimérico recombinante ou um fragmento do mesmo com a especificidade de ligação do anticorpo B-ly1 de murino, tendo glicosilação alterada resultante de atividade aumentada de GnTIII. A atividade aumentada de GnTIII resulta em um aumento no percentual de oligossacarídeos bisseccionados, bem como em uma diminuição no percentual de resíduos de fucose, na região Fc da ABM modificada. Esse anticorpo, ou fragmento do mesmo, tem afinidade de ligação aumentada ao receptor Fc e função efetuada aumentada. Além disso, a invenção é dirigida a um fragmento de anticorpo e proteínas de fusão compreendendo uma região que é equivalente à região Fc de imunoglobulinas.

#### Aplicações Terapêuticas das ABMs modificadas de acordo com os métodos de acordo com os métodos.

[000236] No sentido mais amplo, as ABMs modificadas da presente invenção podem ser usadas para objetivar células *in vivo* ou *in vitro* que expressão um antígeno-alvo, em particular, onde o referido antígeno-alvo é expresso sobre a superfície celular. As células expressando um antígeno-alvo podem ser objetivadas para fins

diagnósticos ou terapêuticos. Em um aspecto, as ABMs modificadas da presente invenção podem ser usadas para alterar a atividade de sinalização de célula em células expressando um antígeno-alvo. Em outro aspecto, as ABMs modificadas da presente invenção podem ser usadas para alterar a reticulação e/ou oligomerização de um ou mais antígenos-alvo. Antígenos-alvo para as ABMs modificadas da presente invenção podem ser receptores na superfície celular incluindo, mas não limitado a, CD20, CD21, CD22, CD19, CD47, CD99, CD2, CD45, HER1 (EGFR), Her2/neu, Her3, Her4, receptores TRAIL (por exemplo, TRAILR1, TRAILR2), TNFR, receptores FGF (por exemplo, FGFR1), receptores IGF, receptores PDGF, receptores VEGF e outros receptores associados à superfície celular. Em uma modalidade particular, o antígeno-alvo é CD20. As ABMs modificadas da invenção também atuam para interromper o ciclo celular, causar apoptose das células-alvo (por exemplo, células tumorígenas) inibir a angiogênese e/ou causar diferenciação de células-alvo.

[000237] Em outro aspecto, a invenção é dirigida a um método para tratamento de uma doença que é tratável através de atividade de sinalização celular alterada de um antígeno-alvo e/ou através de capacidade alterada de mediar a reticulação de um ou mais antígenos-alvo compreendendo administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma ABM modificada da presente invenção a um indivíduo que precisa do mesmo. Em uma modalidade específica, a ABM modificada é um anticorpo. Em uma modalidade mais específica, o anticorpo é humanizado. Exemplos de doenças para as quais as ABMs modificadas podem ser administradas incluem, mas não estão limitadas a, doenças ou distúrbios de proliferação celular, doenças ou distúrbios auto-imunes e doenças ou distúrbios relacionados à infecção bacteriana ou viral.

[000238] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio é um distúrbio

de proliferação celular. Exemplos de distúrbios de proliferação celular que podem ser tratados por uma ABM da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, neoplasmas, cânceres, malignidades e/ou tumores localizados no abdômen, osso, mama, sistema digestivo, fígado, pâncreas, peritônio, glândulas endócrinas (adrenal, paratireóide, pituitária, testículo, ovário, timo, tireóide), olho, cabeça e pescoço, sistema nervoso (central e periférico), sistema linfático, pélvis, pele, tecidos moles, baço, região torácica e sistema urogenital. Neoplasmas, cânceres, malignidades e/ou tumores particulares que podem ser tratados com as ABMs da invenção incluem, mas não estão limitados a, carcinomas de célula epidérmica e escamosa, gliomas, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, carcinomas de células renais, câncer de cólon, câncer cólon-retal, câncer de pulmão, câncer de cérebro, melanoma maligno, leucemia, linfomas, linfomas de célula T, mieloma múltiplo, câncer gástrico, câncer cervical, carcinoma endometrial, câncer esofageal, câncer de fígado, câncer cutâneo, carcinoma do trato urinário, coriocarcinoma, câncer faringeal, câncer laringeal, tecomatose, androblastoma, hiperplasia do endométrio, endometriose, embrioma, fibrossarcoma, sarcoma de Kaposi, hemangioma, hemangioma cavernoso, angioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, neurofibroma, oligodendroglioma, meduloblastoma, ganglioneuroblastoma, glioma, rhabdmiossarcoma, hamartoblastoma, sarcoma osteogênico, leiomiossarcoma, sarcoma da tireóide, sarcoma de Ewing e tumor de Wilms.

[000239] Similarmente, outros distúrbios de proliferação celular também podem ser tratados com as ABMs modificadas da presente invenção. Exemplos de tais distúrbios de proliferação celular incluem, mas não limitados a, hipergamaglobulinemia, distúrbios lipoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidose, síndrome de

Sezary, macroglobulinemia de Waldenström, doença de Gaucher, histiositose e qualquer outra doenças de proliferação celular, além de neoplasia, localizada em um sistema de órgão listado acima.

[000240] Exemplos de doenças ou distúrbios auto-imunes incluem, mas não estão limitados a, trombocitopenias imunomediadas, tais como trombocitopenia púrpura idiopática aguda e trombocitopenia púrpura idiopática crônica, dermatomiosite, coreia de Sydenham, nefrite por lúpus, febre reumática, síndromes poliglandulares, púrpura de Henoch-Schönlein nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, doença de Addison, eritema multiforme, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiíte obliterans, cirrose biliar primária, tireoidite de Hashimoto, tireotoxicose, hepatite crônica ativa, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, pênfigo vulgaris, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsalis, polimiálgia, anemia perniciosa, glomerulonefrite de progressão rápida e alveolite fibrosante, respostas inflamatórias, tais como doenças inflamatórias da pele, incluindo psoríase e dermatite (por exemplo, dermatite atópica); escleroderma sistêmico e esclerose; respostas associadas à doença inflamatória do intestino (tal como doença de Crohn e colite ulcerativa); síndrome de dificuldade respiratória (incluindo síndrome de dificuldade respiratória em adultos; ARDS); dermatite; meningite; encefalite; uveíte; colite; glomerulonefrite; condições alérgicas, tais como eczema e asma e outras condições envolvendo infiltração de células T e respostas inflamatórias crônicas; aterosclerose; deficiência de adesão leucocitária; artrite reumatóide; lúpus eritematoso sistêmico (SLE); diabetes mellitus (por exemplo, diabetes mellitus do tipo 1 ou diabetes mellitus por deficiência de insulina); esclerose múltipla; síndrome de Raynaud; tireoidite auto-imune; encefalomielite alérgica; síndrome de

Sjorgen; diabetes com início juvenil; e respostas imunes associadas à hiperssensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T tipicamente encontrados em tuberculose, sarcoidose; polimiosite, granulomatose e vasculite; anemia perniciosa (doença de Addison); doenças envolvendo diapedese leucocitária; distúrbio inflamatório do sistema nervoso central (CNS); síndrome de lesão múltipla de órgão; anemia hemolítica (incluindo, mas não limitado a, crioglobulinemia ou anemia Coombs-positiva); miastenia gravis; doenças mediadas pelo complexo antígeno-anticorpo; doença da membrana de base anti-glomerular; síndrome anti-fosfolípido; neurite alérgica; doença de Graves; síndrome miastênica de Lambert-Eaton; pênfigo bolhoso; pênfigo; poliendocrinopatias auto-imunes; doença de Reiter; síndrome de Stiffman; doença de Behcet; arterite de células gigantes; nefrite do complexo imune; nefropatia por IgA; polineuropatias por IgM; trombocitopenia púrpura imune (ITP); ou trombocitopenia auto-imune, etc.

[000241] As ABMs modificadas da presente invenção podem ser usadas sozinhas ou em combinação com outros tratamentos ou agentes terapêuticos para tratar distúrbios que são tratáveis através de aumento ou diminuição da atividade de sinalização e/ou reticulação de um ou mais antígenos-alvo. Em uma modalidade, ABMs modificadas da presente invenção podem ser usadas sozinhas para objetivar e matar células tumorígenas *in vivo*. As ABMs modificadas também podem ser usadas em conjunto com um agente terapêutico apropriado para tratar carcinoma humano. Por exemplo, as ABMs modificadas podem ser usadas em combinação com métodos de tratamento padrões ou convencionais, tais como quimioterapia, terapia de radiação ou podem ser conjugadas ou ligadas a um fármaco ou toxina terapêutica, bem como a uma linfocina ou um fator de crescimento inibitório de tumor, para a distribuição do agente terapêutico ao local

do carcinoma. Em modalidades particulares, os conjugados das ABMs modificadas da presente invenção incluem (1) imunotoxinas (conjugados da ABM modificada e uma porção citotóxica) e (2) ABMs modificadas rotuladas (por exemplo, radio-rotuladas, enzima-rotuladas ou fluorocroma-rotuladas) nas quais o rótulo proporciona um meio para a identificação de complexos imunes que incluem a ABM rotulada. As ABMs modificadas também podem ser usadas para induzir à lise através do processo natural de complemento e interagir com células citotóxicas anticorpo-dependentes normalmente presentes.

[000242] A porção citotóxica da imunotoxina pode ser um fármaco citotóxico ou uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana ou vegetal ou um fragmento enzimaticamente ativo (“cadeia A”) de tal toxina. Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos dos mesmos usados são cadeia A de difteria, fragmentos ativos de não ligação da toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de monodecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Fitolacca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina e enomicina. Em outra modalidade, as ABMs modificadas são conjugadas a fármacos anti-câncer de pequena moléculas. Conjugados da ABM modificada e tais porções citotóxicas são feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais. Exemplos de tais reagentes são SPDP, IT, derivados bifuncionais de imidoésteres, tal como HCl de dimetil adipimidato, ésteres ativos, tal como suberato de dissuccinimidila, aldeídos, tal como glutaraldeído, compostos de bis-azido, tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina, diisocianatos, tal como 2,6-diisocianato de tolileno e compostos de flúor bis-ativos, tal como 1,5- difluoro-2,4-

dinitrobenzeno. A porção de lise de uma toxina pode ser unida ao fragmento Fab das ABMs modificadas. Toxinas apropriadas adicionais são conhecidas na técnica, conforme evidenciado, por exemplo, no Pedido de Patente U.S. publicado No. 2002/0128448, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[000243] Em uma modalidade, a molécula de ligação a antígeno da presente invenção é conjugada a uma porção adicional, tal como um radiorrótulo ou uma toxina. Tais ABMs modificadas conjugadas podem ser produzidas através de numerosos métodos que são bem-conhecidos na técnica.

[000244] Uma variedade de radionuclídeos são aplicáveis à presente invenção e aqueles versados na técnica são creditados com a capacidade de determinar prontamente qual radionuclídeo é mais apropriado sob uma variedade de circunstâncias. Por exemplo  $^{131}\text{I}$  iodo é um radionuclídeo bem-conhecido usado para imunoterapia objetivada. Contudo, a utilidade clínica do  $^{131}\text{I}$  iodo pode estar limitada por vários fatores, incluindo: meia-vida física de oito dias; deatogenação de anticorpo iodinado no sangue e nos locais de tumor; e características de emissão (por exemplo, grande componente-gama) os quais podem ser sub-ótimos para depósito dose-localizado no tumor. Com o advento de agentes de quelação superiores, a oportunidade de fixação de grupos de quelação de metal à proteínas tem aumentado as oportunidades de utilizar outros radionuclídeos, tais como  $^{111}\text{In}$  índio e  $^{90}\text{Y}$  ítrio.  $^{90}\text{Y}$  ítrio proporciona vários benefícios para utilização em aplicação radioimuno-terapêuticas: a meia-vida de 64 horas do  $^{90}\text{Y}$  ítrio é longa o bastante para permitir acúmulo de anticorpo pelo tumor e, diferente do  $^{131}\text{I}$  iodo, por exemplo, o  $^{90}\text{Y}$  ítrio é um beta emissor puro de alta energia sem irradiação gama associada em seu decay, com uma faixa em tecido de 100 a 1000 diâmetros de célula. Além disso, a quantidade mínima de radiação que penetra permite a

administração ambulatorial de anticorpos rotulados com <sup>90</sup>ítrio. Adicionalmente, internalização de anticorpo rotulado não é requerida para morte celular e a emissão local de radiação ionizante seria letal para células tumorígenas adjacentes carecendo do antígeno-alvo.

[000245] Dosagens de único tratamento eficazes (isto é, quantidades terapeuticamente eficazes) de ABMs modificadas rotuladas com <sup>90</sup>ítrio da presente invenção oscilam de entre cerca de 5 e cerca de 75 mCi, mais preferivelmente entre cerca de 10 e cerca de 40 mCi. Dosagens não-ablativas de medula para um único tratamento eficaz de <sup>131</sup>iodo da presente invenção oscilam de entre cerca de 5 e cerca de 70 mCi, mais preferivelmente entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi. Dosagens ablativas para um único tratamento eficaz (isto é, pode requerer transplante de medula óssea autólogo) de anticorpos rotulados com <sup>131</sup>iodo da presente invenção oscilam de entre cerca de 30 e cerca de 60 mCi, mais preferivelmente entre cerca de 50 e menos do que cerca de 500 mCi. Em conjunto com um anticorpo quimérico de acordo com a presente invenção, levando-se em conta a meia-vida em circulação mais longa vis-a-vis anticorpos de murino, dosagens não-ablativas na medula para um único tratamento eficaz de anticorpos quiméricos rotulados com <sup>131</sup>iodo oscilam entre cerca de 5 e 40 mCi, mais preferivelmente menos do que cerca de 30 mCi. Critérios para formação de imagem, por exemplo, para o rótulo <sup>101</sup>índio são, tipicamente, menos que cerca de 5 mCi.

[000246] Com relação aos anticorpo radiorrotulados da presente invenção, terapia com os mesmos pode ocorrer também usando um único tratamento de terapia ou usando múltiplos tratamentos . Em virtude do componente radio-nuclídeo, é preferido que, antes de tratamento, células tronco periféricas (“PSC”) ou medula óssea (“BN”) sejam “coletadas” para pacientes experimentando toxicidade na medula óssea potencialmente fatal resultante de radiação. BM e/ou



PSC são coletadas usando técnicas padrões e, então, purgadas e congeladas para possível reinfusão. Adicionalmente, é mais preferido que, antes de tratamento, um estudo de dosimetria diagnóstica usando um anticorpo diagnóstico rotulado (por exemplo, usando  $^{101}\text{Índio}$ ) seja conduzido no paciente, uma finalidade do qual é assegurar que o anticorpo terapeuticamente rotulado (por exemplo, usando  $^{90}\text{Ítrio}$ ) não se torne desnecessariamente “concentrado” em qualquer órgão ou tecido normal.

[000247] Em uma modalidade, uma ABM modificada glico-manipulada quimérica da presente invenção é conjugada à cadeia A de ricina. Mais vantajosamente, a cadeia A de ricina é desglicosilada e produzida através de meios recombinantes. Um método vantajoso de fabricação da imunotoxina de ricina é descrito em Vitetta e outros, *Science* 238, 1098 (1987), aqui incorporado por referência.

[000248] Quando usados para matar células cancerígenas humanas ou fins diagnósticos *in vitro*, os conjugados serão, tipicamente, adicionados ao meio de cultura de célula em uma concentração de pelo menos cerca de 10 nM. A formulação e um modo de administração para uso *in vitro* não são críticos. Formulações aquosas que são compatíveis com o meio de cultura ou o meio de perfusão normalmente serão usadas. Citotoxicidade pode ser lida através de técnicas convencionais para determinar a presença ou o grau de câncer.

[000249] Conforme discutido acima, um produto radio-farmacêutico citotóxico para o tratamento de câncer pode ser feito através de conjugação a um isótopo radiativo (por exemplo, I, Y, Pr) a uma ABM modificada e/ou glico-manipulada quimérica da presente invenção. O termo “porção citotóxica”, conforme usado aqui, se destina a incluir tais isótopos.

[000250] Em outra modalidade, lipossomas são enchidos com um

fármaco citotóxico e os lipossomas são revestidos com as ABMs da presente invenção. Em virtude do fato de muitas das moléculas-alvo para as ABMs modificadas da presente invenção serem expressas sobre a superfície celular (por exemplo, existem tantas moléculas de CD20 sobre a superfície das células B malignas, esse método permite distribuição de grandes quantidades de fármaco ao tipo correto de célula).

[000251] Técnicas para conjugação de tais agentes terapêuticos a anticorpos são bem-conhecidas (vide, por exemplo, Arnon e outros, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld e outros (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom e outros, "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2<sup>a</sup> Ed.), Robinson e outros. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera e outros (eds.), páginas 475-506 (1985); e Thorpe e outros, "The Preparation e Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982) (cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade).

[000252] Ainda outras aplicações terapêuticas para as ABMs da invenção incluem conjugação ou ligação, por exemplo, através de técnicas de DNA recombinante, a uma enzima capaz de converter um pró-fármaco em um fármaco citotóxico e o uso desse conjugado de anticorpo-enzima em combinação com o pró-fármaco para converter o pró-fármaco em um agente citotóxico no local do tumor (vide, por exemplo, Senter e outros, "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 55: 4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro e in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal

Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates”, *Cancer Research* 49: 5789-5792 (1989); e Senter, “Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy,” *FASEB J.* 4: 188-193 (1990)).

[000253] Ainda outro uso terapêutico para as ABMs da invenção envolve o uso, não conjugado, na presença de complemento ou como parte de um conjugado de anticorpo-fármaco ou anticorpo-toxina, para remover células tumorígenas da medula óssea de pacientes com câncer. De acordo com essa abordagem, medula óssea autóloga podem ser purgadas *ex vivo* através de tratamento com o anticorpo e a medula infundida de volta no paciente (vide, por exemplo, Ramsay e outros, “Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies”, *J. Clin. Immunol.* 8(2): 81-88 (1988)).

[000254] Além disso, considera-se que a invenção compreende uma cadeia de imunoglobulina simples compreendendo domínios de ligação a antígeno que permitem substancialmente a mesma especificidade de ligação que o anticorpo precursor (por exemplo, polipeptídeos compreendendo as CDRs do anticorpo precursor) e ainda compreendendo um polipeptídeo de toxina. As imunotoxinas com cadeia simples da invenção podem ser usadas para tratar carcinoma humano *in vivo*.

[000255] Similarmente, uma proteína de fusão compreendendo pelo menos uma região de ligação a antígeno de uma ABM da invenção unida a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma segunda proteína tendo atividade anti-tumor, por exemplo, linfocina ou oncostatina, pode ser usada para tratar carcinoma humano *in vivo*.

[000256] A presente invenção proporciona um método para matar seletivamente células tumorígenas expressando receptores na superfície celular incluindo, mas não limitado a CD20, HER1 (EGFR), Her2/neu, Her3, Her4, receptores TRAIL (por exemplo, TRAILR1,

TRAILR2), TNFR, receptores FGF (por exemplo, FGFR1), receptores IGF, receptores PDGF, receptores VEGF e outros receptores associados à superfície celular. Esse método compreende relação da ABM modificada da invenção (conjugada, por exemplo, como uma imunotoxina ou não conjugada) com as referidas células tumorígenas. Essas células tumorígenas podem ser de um carcinoma humano.

[000257] Adicionalmente, a presente invenção proporciona um método de tratamento de carcinomas (por exemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Esse método compreende administração, a um indivíduo, de uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma composição contendo pelo menos uma das ABMs modificadas da invenção (conjugadas, por exemplo, como uma imunotoxina ou não conjugadas.)

[000258] Em um outro aspecto, a invenção é dirigida a um método aperfeiçoado para o tratamento de distúrbios proliferativos de células- $\beta$ , incluindo linfoma de células- $\beta$ , bem como uma doença auto-imune produzida, no todo ou em parte, por auto-anticorpos patogênicos, baseado em depleção de células- $\beta$  compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma ABM da presente invenção a um ser humano que precisa do mesmo. Em uma modalidade preferida, a ABM é um anticorpo anti-CD20 glico-manipulado com uma especificidade de ligação substancialmente a mesma que aquela do anticorpo B-ly1 de murino. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é humanizado. Nesse aspecto da invenção, as ABMs da invenção são usadas para privar o sangue de células- $\beta$  normais durante um período de tempo prolongado.

[000259] De acordo com a prática da presente invenção, o indivíduo pode ser um ser humano, eqüino, suíno, bovino, murino, canino, felino, e aves. Outros animais de sangue quente também são inclusos na presente invenção.

[000260] A invenção em questão ainda compreende métodos para a inibição do crescimento de células tumorígenas humanas, tratamento de um tumor em um indivíduo e tratamento de uma doença do tipo proliferativo em um indivíduo. Esses métodos compreendem a administração, ao indivíduo, de uma quantidade eficaz da composição da invenção.

[000261] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma ABM de acordo com a presente invenção para uso no tratamento ou profilaxia de câncer, uma condição ou lesão pré-cancerígena ou um distúrbio auto-imune. Em ainda outra modalidade, a invenção se refere a uma ABM de acordo com a presente invenção para uso como um medicamento para o tratamento ou profilaxia de câncer, uma condição ou lesão pré-cancerígena ou uma doença auto-imune. O câncer pode ser, por exemplo, linfoma de células- $\beta$ , câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCL), câncer de pulmão de células bronquialveolares, câncer de osso, câncer pancreático, câncer de pele, câncer da cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intra ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer de estômago, câncer gástrico, câncer de colón, câncer de mama, câncer uterino, carcinoma das trompas falopianas, carcinoma do endométrio, carcinoma do cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tiróide, câncer da glândula paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer de próstata, câncer da bexiga, câncer do rim ou ureter, carcinoma de células renais, carcinoma da pélvis renal, mesotelioma, câncer hepatocelular, câncer biliar, leucemia aguda ou crônica, linfomas linfocíticos, neoplasmas do sistema nervoso central (CNS), tumores do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, glioblastoma multiforme,

astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenomas da pituitária, incluindo versões resistentes de qualquer um dos cânceres acima ou uma combinação de um ou mais dos cânceres acima. A condição ou lesão pré-cancerígena inclui, por exemplo, o grupo consistindo em leucoplasia oral, queratose actínica (queratose solar), pólipos pré-cancerígenos do cólon ou reto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de câncer de cólon de não-polipose hereditária (HNPCC), esôfago de Barrett, displasia de bexiga e condições cervicais pré-cancerígenas.

[000262] De preferência, o câncer é selecionado do grupo consistindo em linfoma de células- $\beta$ , câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de rim e câncer de cérebro. Exemplos de distúrbios auto imunes são fornecidos acima.

[000263] Ainda outra modalidade é o uso da ABM de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de câncer ou para o tratamento ou profilaxia de uma condição ou lesão pré-cancerígena. Câncer e condição ou lesão pré-cancerígena são definidos conforme acima.

[000264] É evidente, portanto, que a presente invenção abrange composições farmacêuticas, combinações, usos e métodos para tratamento de carcinomas humanos. Por exemplo, a invenção inclui composições farmacêuticas para uso no tratamento de carcinomas humanos compreendendo uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um anticorpo da presente invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[000265] As composições de ABM da invenção podem ser administradas usando modos convencionais de administração

incluindo, mas não limitado a, intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática ou administração diretamente no tumor. Administração intravenosa é preferida.

[000266] Em um aspecto da invenção, formulações terapêuticas contendo as ABMs da invenção são preparadas para armazenamento através de mistura de um anticorpos tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os recipientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos, tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácido, tais como, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo, glicose, manose ou dextrinas; agentes de quelação, tal como EDTA; açúcares, tais como, sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal, tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos, tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG).

[000267] Formulações de ABM anti-CD20 exemplificativas são descritas no WO98/56418, expressamente incorporado aqui por

referência. Essa publicação descreve uma formulação multi-dose líquida compreendendo 40 mg/mL de rituximab, acetato a 25 mM, trealose a 150 mM, álcool benzílico a 0.9%, polissorbato 20 a 0,02% em um pH de 5,0 que tem uma vida útil mínima de 2 anos de armazenamento a 2-8°C. Outra formulação anti-CD20 de interesse compreende 10 mg/mL de rituximab em 9,0 mg/mL de cloreto de sódio, 7,35 mg/mL de dihidrato de citrato de sódio, 0,7 mg/mL de polissorbato 80 e água estéreo para injeção, pH de 6,5. Na presente invenção, rituximab pode ser substituído por uma ABM modificada da presente invenção.

[000268] Formulações liofilizadas adaptadas para administração subcutânea são descritas no WO97/04801. Tais formulações liofilizadas podem ser reconstituídas com um diluente adequado para uma alta concentração de proteína e a formulação reconstituída pode ser administrada subcutaneamente ao mamífero a ser tratado aqui.

[000269] A formulação aqui também pode conter mais de um composto ativo, conforme necessário para a indicação que está sendo tratada em particular, de preferência, aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente uns aos outros. Por exemplo, pode ser desejável proporcionar ainda um agente citotóxico, agente quimioterapêutico, citocina ou agente imunossupressor (por exemplo, um o qual atua sobre células T, tal como ciclosporina ou um anticorpo que se liga à células T, por exemplo, um o qual se liga ao LFA-1). A quantidade eficaz desses outros agentes depende da quantidade de antagonista presente na formulação, do tipo de doenças ou distúrbio ou tratamento e dos outros fatores discutidos acima. Esses geralmente são usados na mesma dosagem e com as vias de administração conforme usado aqui antes ou de cerca de 1 a 99% das dosagens empregadas aqui antes.

[000270] Os ingredientes ativos podem também estar contidos em



microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de gelatina ou hidroximetil celulose e microcápsulas de (poli)metilmetacrilato, respectivamente, em sistemas de distribuição de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em microemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

[000271] Preparados com liberação sustentada podem ser feitos. Exemplo adequados de preparados com liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o antagonista, matrizes as quais estão na forma de artigos formatados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes com liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, (poli)2-hidróxietil- metacrilato ou álcool (poli)vinílico, polilactídeos (Pat. U.S. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e yetil-L-glutamato, etileno- acetato de vinila não degradável, copolímeros de ácido láctico- ácido glicólico degradáveis, tal como o LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico- ácido glicólico e acetato de leuprolida e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[000272] As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é prontamente obtido por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis.

[000273] As composições da invenção podem estar em uma variedade de formas de dosagem as quais incluem, mas não estão limitadas a, soluções ou suspensões líquidas, comprimidos, pílulas, pós, supositórios, microcápsulas ou microvesículas poliméricas, lipossomas e soluções injetáveis ou infusíveis. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

[000274] As composições da invenção também incluem, de preferência, veículos e adjuvantes convencionais farmacologicamente aceitáveis conhecidos na técnica, tais como albumina de soro humano, permutadores de íons, alumina, lecitina, substâncias tampão tais como fosfatos, glicina, ácidos sórbico, sorbato de potássio e sais ou eletrólitos, tal como sulfato de protamina.

[000275] O modo mais eficaz de administração e o regime de dosagem para as composições farmacêuticas da presente invenção dependem da gravidade e do curso da doença, da saúde do paciente e da resposta ao tratamento e do julgamento do médico que faz o tratamento. Conseqüentemente, as dosagens das composições deverão ser tituladas para o paciente individual. Todavia, uma dose eficaz das composições da presente invenção geralmente estará na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 2000 mg/kg.

[000276] As moléculas descritas aqui podem estar em uma variedade de formas de dosagem as quais incluem, mas não estão limitadas a, soluções ou suspensões líquidas, comprimidos, pílulas, pós, supositórios, microcápsulas ou microvesículas poliméricas, lipossomas e soluções injetáveis ou infusíveis. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

[000277] As dosagens da presente invenção podem, em alguns casos, ser determinadas através do uso de biomarcadores previsíveis. Biomarcadores previsíveis são marcadores moleculares que são usados para determinar (isto é, observar e/ou quantificar) um padrão de expressão e/ou ativação de genes ou proteínas tumor-relacionadas ou componentes celulares de uma via de sinalização tumor-relacionada. Elucidação dos efeitos biológicos de terapias objetivadas em tecido de tumor e correlação desses efeitos com a resposta clínica ajuda a identificar as vias de sobrevivência e crescimento predominantes operativas em tumores, desse modo, estabelecendo

um perfil de prováveis respondedores e, inversamente, proporcionando uma razão para projetar estratégias para superar a resistência à terapia. Por exemplo, onde a ABM modificada é um anticorpo específico para EGFR, bio-marcadores para terapia anti-EGFR podem compreender uma ou mais moléculas que estão a jusante na via de sinalização de EGFR, levando a um distúrbio de proliferação celular incluindo, mas não limitado a, Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 (Mitchell, *Nature Biotech.* 22: 363-364 (2004); Becker, *Nature Biotech* 22: 15-18 (2004); Tsao e Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)). Biomarcadores para terapia anti-EGFR também podem compreender receptores do fator de crescimento, tais como EGFR, ErbB-2 (HER2/neu) e ErbB-3 (HER3) e podem ser prognósticos positivos ou negativos de resposta do paciente à terapia anti-EGFR. Por exemplo, o receptor de fator de crescimento ErbB-3 (HER3) foi determinado como sendo um biomarcador prognóstico negativo para o anticorpo anti-EGFR ABX-EGF (Pub. de Pedido de Patente U.S. No. 2004/0132097 A1)

[000278] Biomarcadores prognósticos podem ser medidos através de ensaios celulares que são bem-conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, imunoistoquímica, citometria de fluxo, imunofluorescência, ensaios de captura-e-detecção e ensaios de fase reversa e/ou ensaios apresentados na Pub. de Pedido de Patente U.S. No. 2004/0132097 A1, os conteúdos todos do qual são aqui incorporados por referência. Biomarcadores prognósticos de terapia anti-EGFR, em si, podem ser identificados de acordo com as técnicas ensinadas na Pub. de Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0190689A1, os conteúdos da qual são aqui incorporados por referência.

[000279] Assim, em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para o tratamento de um distúrbio que está relacionado à sinalização celular alterada ou desregulada por um antígeno-alvo e/ou

capacidade alterada de mediar a reticulação e/ou oligomerização de um ou mais antígenos-alvo compreendendo prognóstico de uma resposta à terapia com uma ABM modificada em um ser humano que precisa de tratamento avaliando uma amostrado ser humano antes de terapia com um ou uma pluralidade de reagente que detectam a expressão e/ou ativação de biomarcadores prognósticos para um distúrbio que está relacionado à sinalização celular alterada ou desregulada por um antígeno-alvo e/ou capacidade alterada de mediar a reticulação e/ou oligomerização de um ou mais antígenos-alvo (tal como câncer); determinação de um padrão de expressão e/ou ativação de um ou mais dos biomarcadores prognósticos, em que o padrão prevê a resposta do ser humano à terapia com a ABM modificada; e administração a um ser humano que é previsto como respondendo positivamente ao tratamento com a ABM modificada, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo uma ABM modificada da presente invenção. Conforme usado aqui, um ser humano que é previsto como respondendo positivamente ao tratamento com uma ABM modificada é um para o qual a ABM modificada terá um efeito mensurável sobre a doença ou distúrbio que é relacionado à sinalização celular alterada ou desregulada por um antígeno-alvo e/ou capacidade alterada de mediar a reticulação e/ou oligomerização de um ou mais antígenos-alvo (por exemplo, regressão/retração de tumor) e para o qual os benefícios da terapia com ABM modificada não são suplantados por efeitos adversos (por exemplo, toxicidade). Conforme usado aqui, uma amostra significa qualquer amostra biológica de um organismo, particularmente um ser humano, compreendendo uma ou mais células, incluindo células simples de qualquer origem, amostras de tecido ou biópsia as quais tenham sido removidas de órgãos tais como mama, pulmão, trato gastrintestinal, pele, cérvix, ovário, próstata, rim, cérebro, cabeça

e pescoço, ou qualquer outro órgão ou tecido do corpo e outras amostras corporais incluindo, mas não limitado a esfregaços, escarro, secreções, fluído cérebro – espinhal, bile, sangue, fluído linfático, urina e fezes.

[000280] A composição compreendendo uma ABM modificada da presente invenção será formulada, dosada e administrada de um modo consistente com a boa prática médica. Fatores para considerar nesse contexto incluem a doença ou distúrbio que está sendo tratado em particular, o mamífero que está sendo tratado em particular, o local de distribuição do agente, o método de administração, o esquema de administração e outros fatores conhecidos pelos praticantes de medicina. A quantidade terapeuticamente eficaz do antagonista a ser administrada será orientada por tais considerações.

[000281] Como uma proposição geral, a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo administrada parenteralmente por dose estará na faixa de cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal do paciente por dia, com a faixa inicial típica de antagonista sendo usada na faixa de cerca de 2 a 10 mg/kg.

[000282] Também preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 15 mg/kg.

[000283] Também mais preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 12mg/kg.

[000284] Também mais preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg.

[000285] Também mais preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg.

[000286] Mais preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,5 mg/kg.

[000287] Também mais preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 4,5 mg/kg.

[000288] Também mais preferivelmente, a ABM modificada é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 12 mg/kg.

[000289] Em uma modalidade preferida, a ABM modificada é um anticorpo, de preferência um anticorpo humanizado. Dosagens adequadas para tal anticorpo não conjugado estão, por exemplo, na faixa de cerca de 20 mg/m a cerca de 1000 mg/m. Em uma modalidade, a dosagem do anticorpo difere daquela presentemente recomendada para o rituximab. Por exemplo, pode-se administrar ao paciente uma ou mais doses de substancialmente menos do que cerca de 375 mg/m<sup>2</sup> de anticorpo, por exemplo, onde a dose está na faixa de cerca de 20 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 250 mg/m<sup>2</sup>, por exemplo, de cerca de 50 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 200 mg/m<sup>2</sup>.

[000290] Além disso, pode-se administrar uma ou mais doses iniciais do anticorpo seguido por uma ou mais doses subsequêntes, em que a dose mg/m<sup>2</sup> do anticorpo nas doses subsequêntemente excede a dose mg/m<sup>2</sup> do anticorpo na(s) dose(s) inicial(ais). Por exemplo, a dose inicial pode estar na faixa de cerca de 20 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 250 mg/m<sup>2</sup> (por exemplo, de cerca de 50 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 200mg/m<sup>2</sup>) e a dose subsequênte pode estar na faixa de cerca de 250 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 1000 mg/m<sup>2</sup>.

[000291] Conforme notado acima, contudo, essas quantidades sugeridas de ABM modificada estão sujeitas a uma grande cota de discernimento terapêutico. O fator chave na seleção de uma dose e um esquema apropriados é o resultado obtido, conforme indicado acima. Por exemplo, doses relativamente maiores podem ser necessárias inicialmente para o tratamento de doenças agudas e em

andamento. Para obter os resultados mais eficazes, dependendo da doença ou distúrbio, o antagonista é administrado tão logo o primeiro sinal, diagnóstico ou aparecimento ou ocorrência da doença ou distúrbio quanto possível ou durante remissões da doença ou distúrbio.

[000292] A ABM modificada da presente invenção é administrada através de quaisquer meios adequados, incluindo parenteral, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal e, se desejado, para tratamento imunossupressor, administração intralesional. Infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Além disso, o antagonista pode ser, adequadamente, administrado através de infusão pulsada, por exemplo, com doses decrescentes do antagonista. De preferência, a dosagem é fornecida através de injeções, mais preferivelmente injeções intravenosas ou subcutâneas dependendo, em parte, se a administração é breve ou crônica.

[000293] Pode-se administrar outros compostos, tais como agentes citotóxicos, agentes quimioterapêuticos, agentes imunossupressores e/ou citocinas com os antagonistas aqui. A administração combinada inclui co-administração, usando formulações distintas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva em qualquer ordem em que, de preferência, há um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente suas atividades biológicas.

[000294] Será claro que a dose da composição da invenção requerida para obter curas pode ser ainda reduzida com otimização do esquema.

[000295] De acordo com a prática da invenção, o veículo farmacêutico pode ser um veículo lipídico. O veículo lipídico pode ser um fosfolipídio. Ainda, o veículo lipídico pode ser um ácido graxo.

Também, o veículo lipídico pode ser um detergente. Conforme usado aqui, um detergente é qualquer substância que altera a tensão de superfície de um líquido, geralmente reduzindo-a.

[000296] Em um exemplo da invenção, o detergente pode ser um detergente não-iônico. Exemplos de detergentes não-iônicos incluem, mas não estão limitados a, polissorbato 80 (também conhecido com Tween 80 ou monooleato de polioxietilenossorbitan), Brij e Triton (por exemplo, Triton WR-1339 e Triton A-20).

[000297] Alternativamente, o detergente pode ser um detergente iônico. Um exemplo de um detergente iônico inclui, mas não está limitado a, brometo de alquiltrimetilamônio.

[000298] Adicionalmente, de acordo com a invenção, o veículo lipídico pode ser um lipossoma. Conforme usado no presente pedido, um “lipossoma” é qualquer vesícula ligada à membrana a qual contém quaisquer moléculas da invenção ou combinações das mesmas.

[000299] Os exemplos abaixo explicam a invenção em maiores detalhes. Os preparados e exemplos a seguir são fornecidos para permitir que aqueles versados na técnica compreendam e pratiquem mais claramente a presente invenção. A presente invenção, contudo, não está limitada, quanto ao escopo, pelas modalidades exemplificadas, as quais se destinam a ilustrar os aspectos únicos da invenção apenas e métodos os quais são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. Na verdade, várias modificações da invenção, além daquelas descritas aqui, se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição precedente e desenhos em anexo. Tais modificações se destinam a cair dentro do escopo das reivindicações em anexo.

### Exemplos

[000300] A menos que de outro modo especificado, referências à numeração de posições de resíduo de aminoácido específicas nos



Exemplos a seguir são de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

#### Exemplo 1

##### Materiais e Métodos

##### Clonagem e Expressão de anticorpo B-ly1 recombinante

[000301] Células de hibridoma expressando B-ly1 (vide, por exemplo, Poppema, S. e outros, 1987, *Proceedings of the 9<sup>o</sup> Biotest Symposium*, Institute of Education, Londres, (Sonneborn, H.H. e Tills, D, Eds.); Ling, N.R. e outros, 1987, em *Leucocyte Typing Conference III: White cell differentiation antigens*, 302-355, Oxford University Press, Oxford. (AJ. McMichael, Ed.); Knapp, W. 1990. *Leukocyte Typing Conference TV Proceedings*, Oxford University Press, Oxford) foram crescidas em RPMI contendo FBS a 10% e L-glutamina a 4 mM.  $6 \times 10^6$  células com uma viabilidade > 90% foram coletadas e RNA total foi isolado usando um kit Qiagen RNeasy midi. cDNAs que codificam as cadeias pesada e leve variáveis do B-ly1 foram amplificadas através de RT-PCR. A reação de RT-PCR foi realizada usando as seguintes condições: 30 min a 50 °C para a síntese de cDNA de primeira filamento; desnaturação inicial de 15 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 45 °C, 1,5 min a 72 °C; e uma etapa final de alongamento durante 10 min a 72 °C. O tamanho esperado dos produtos de PCR foi confirmado através de eletroforese. Os produtos de PCR foram clonados em vetores de *E. coli* e seqüenciamento de DNA confirmou que os genes que codificam as cadeias pesada e leve variáveis foram isolados.

[000302] Para construção de vetores de expressão de B-ly1 quimérico, seqüências sinalizadoras sintéticas e sítios de restrição apropriados foram fundidos às cadeias variáveis através de reações de PCR adicionais. Após uma confirmação final da seqüência de DNA correta das cadeias variáveis, elas foram combinadas com as regiões

constantes de IgG1 humana correspondentes. Uma vez que os genes foram construídos, eles foram clonados sob o controle do promotor de MPSV e a montante de um sítio de poliA sintético, usando dois vetores distintos, um para cada cadeia, resultando nos plasmídeos pETR1808 (vetor de expressão de cadeia pesada) e pETR1813 (vetor de expressão de cadeia leve). Cada vetor trazia uma sequência OriP de EBV.

[000303] B-ly1 quimérico foi produzido através de co-transfecção de células HEK293-EBNA com vetores pETR1808 e pETR1813 usando uma abordagem de transfecção com fosfato de cálcio. Células HEK293 –EBNA em crescimento exponencial foram transfectadas através do método com fosfato de cálcio. As células foram crescidas como culturas em monocamadas aderentes em frascos T usando meio de cultura DMEM suplementado com FCS a 10% e foram transfectadas quando elas estavam entre 50 e 80% confluentes. Para a transfecção de um frasco T75, 8 milhões de células foram cultivadas 24 horas antes de transfecção em 14 ml de meio de cultura DMEM suplementado com FCS (a 10% v/v final), 250 µg/ml de neomicina e as células foram colocadas a 37 °C em uma incubadora com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante a noite. Para cada frasco T75 a ser transfectado, uma solução de DNA, CaCl<sub>2</sub> e água foi preparada através de mistura de 47 µg de DNA total de vetor de plasmídeo dividido igualmente entre os vetores de expressão de cadeia pesada e leve, 235 µl de uma solução de CaCl<sub>2</sub> a 1M e adicionando água até um volume final de 459 µl. A essa solução, 469 µl de HEPES a 50 mM, NaCl a 280 mM, solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 1,5 mM em um pH de 7,05 foram adicionados, misturados imediatamente durante 10 s e deixados descansar em temperatura ambiente durante 20 s. A suspensão foi diluída com 12 ml de DMEM suplementado com FCS a 2% e adicionado ao T75 em lugar do meio existente. As células foram

incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante cerca de 17 a 20 horas, então, meio foi substituído por 12 ml de DMEM, FCS a 10%. Para a produção do anticorpo não modificado “chB-Ly1”, as células foram transfectadas apenas com vetores de expressão de anticorpo pET1808 e pETR1813 em uma proporção de 1:1. Para a produção do anticorpo glico-manipulado “chB-Ly1-ge”, as células foram co-transfectadas com quatro plasmídeos, dois para expressão de anticorpo (pETR1808 e pETR1813), um para expressão de uma fusão de GnTIII-poli-peptídeo (pETR1519) e um para expressão de manosidase II (pCLF9) em uma proporção de 4:4:1:1, respectivamente. No dia 5 pós-transfecção, o sobrenadante foi coletado, centrifugado durante 5 min a 1200 rpm, seguido por uma segunda centrifugação durante 10 min a 4000 rpm e mantido a 4 °C.

[000304] chB-Ly1 e chB-Ly1-ge foram purificados do sobrenadante de cultura usando três etapas cromatográficas seqüenciais, cromatografia em Proteína A, cromatografia de troca de cátions e uma etapa de cromatografia por exclusão de tamanho sobre uma coluna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) trocando o tampão para solução salina tamponada com fosfato e coletando o pico de anticorpo monomérico dessa última etapa. A concentração de anticorpo foi estimada usando um espectrofotômetro a partir da absorbância a 280 nm.

#### Análise de oligossacarídeo

[000305] Oligossacarídeos foram enzimaticamente liberados dos anticorpos através de digestão com PNGaseF, com os anticorpos sendo imobilizados sobre uma membrana de PVDF ou em solução.

[000306] A solução de digestão resultante contendo os oligossacarídeos liberados foi diretamente preparada para análise por MALD/TOF-MS ou foi ainda digerida com glicosidase EndoH antes de preparação da amostra para análise por MALDI/TOF-MS.

Método de liberação de oligossacarídeo para anticorpos imobilizados em membrana de PVDF

[000307] As cavidades de uma lâmina com 96 cavidades feitas com uma membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) foram umedecidas com 100 µl de metanol e o líquido foi extraído através da membrana de PVDF usando vácuo aplicado à derivação de vácuo Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). As membranas de PVDF foram lavadas três vezes com 300 µl de água. As cavidades foram, então, lavadas com 50 µl de tampão RCM (Uréia a 8M, Tris a 360 mM, EDTA a 3,2 mM, pH de 8,6). Entre 30-40 µg de anticorpo foram carregados em uma cavidade contendo 10 µl de tampão RCM. O líquido na cavidade foi extraído através da membrana através de aplicação de vácuo e a membrana foi subsequente lavada duas vezes com 50 µl de tampão RCM. A redução das ligações de dissulfeto foi realizada através da adição de 50 µl de ditioneitol a 0,1M em RCM e incubação a 37 °C durante 1 h.

[000308] Após redução, um vácuo foi aplicado para remover a solução de ditioneitol da cavidade. As cavidades foram lavadas três vezes com 300 µl de água antes de realização da carboximetilação nos resíduos de cisteína através da adição de 50 µl de ácido iodoacético a 0,1M em tampão RCM e incubação em temperatura ambiente no escuro durante 30 min.

[000309] Após carboximetilação, as cavidades foram extraídas com vácuo e subsequente lavadas três vezes com 300 µl de água. A membrana de PVDF foi, então, bloqueada, para impedir adsorção da endoglicosidase, através de incubação de 100 µl de uma solução aquosa a 1% de polivinilpirrolidona 360 em temperatura ambiente durante 1 hora. O reagente de bloqueio foi, então, removido através de ligeiro vácuo, seguido por três lavagens com 300 µl de água.

[000310] Oligossacarídeos N-ligados foram liberados através da

adição de 2,5 mU de peptídeo-N-glicosidase F (N-glicanase recombinante, GLYKO, Novato, CA) e 0,1 mU de Sialidase (GLYKO, Novato, CA), para remover quaisquer resíduos de monossacarídeo carregados em potencial, em um volume final de 25 µl em NaHCO<sub>3</sub> a 20 mM, pH de 7,0. Digestão foi realizada durante 3 horas a 37 °C.

#### Método de liberação de oligossacarídeo para anticorpos em solução

[000311] Entre 40 e 50 µg de anticorpo foram misturados com 2,5 mU de PNGaseF (Glyko, E.U.A.) em Tris a 2 mM, pH de 7,0, em um volume final de 25 µl e a mistura foi incubada durante 3 horas a 37 °C.

#### Uso de digestão com endoglicosidase H de oligossacarídeos PNGaseF-liberados para a atribuição de estruturas de oligossacarídeo bisseccionado híbrido a picos de oligossacarídeo neutro em MALDI/TOF-MS

[000312] Os oligossacarídeos liberados com PNGaseF foram subseqüentemente digeridos com Endoglicosidase H (EC 3.2.1.96). Para a digestão com EndoH, 15 mU de EndoH (Roche, Suíça) foram adicionados à digestão de PNGaseF (método de anticorpo em solução acima) para proporcionar um volume final de 30 µl e a mistura foi incubada durante 3 horas a 37 °C. EndoH cliva entre os resíduos de N-acetilglicosamina do núcleo de quitobiase de oligossacarídeos N-ligados. A enzima pode digerir apenas oligomanose e glicanas do tipo mais híbrido, enquanto que oligossacarídeos do tipo complexo não são hidrolisados.

#### Preparação de amostra para MALDI/TOF-MS

[000313] As digestões enzimáticas contendo os oligossacarídeos liberados foram incubadas durante mais 3 h em temperatura ambiente após a adição de ácido acético até uma concentração final de 150 mM e foram subseqüentemente passadas através de 0,6 ml de uma resina de troca de cátions (resina AG50W-X8, forma de hidrogênio, 100-200 mesh, BioRad, Suíça) acondicionada em uma coluna de cromatografia

Micro-bio-spin (BioRad, Suíça) para remover os cátions e proteínas. Um microlitro da amostra resultante foi aplicado a uma lâmina-alvo de aço inoxidável e misturado, sobre a lâmina, com 1 µl de matriz sDHB. A matriz sDHB foi preparada através de dissolução de 2 mg de ácido 2,5-diidróxibenzóico mais 0,1 mg de ácido 5-metóxi-salicílico em 1 ml de etanol/cloreto de sódio aquoso a 10 mM a 1:1 (v/v). As amostras foram secas ao ar, 0,2 µl de etanol foram aplicados e as amostras foram finalmente deixadas re-cristalizar sob ar.

#### MALDI/TOF-MS

[000314] O espectrômetro de massa para MALDI-TOF usado para adquirir os espectros de massa era um Voyager Elite (Perspective Biosystems). O instrumento foi operado na configuração linear, com uma aceleração de 20 kV e retardo de 80 ns. Calibração externa usando padrões de oligossacarídeo foi usada para atribuição de massa dos íons. Os espectros de 200 pontos de laser foram resumidos para obter o espectro final.

#### Depleção de células B de todo o sangue

[000315] 495 µl de sangue heparinizado de um doador saudável foram transformados em alíquotas em tubos de poliestireno de 5 ml, 5 µl de amostras de anticorpo 100 vezes concentradas (concentração final de 1-1000 ng/ml) ou PBS apenas foram adicionados e os tubos foram incubados a 37 °C. Após 24 h, 50 ml de sangue foram transferidos para um tubo novo e corados com anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE e anti-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson) durante 15 min em temperatura ambiente no escuro. Antes de análise, 500 µl de tampão FACS (PBS contendo FCS a 2% e EDTA a 5 mM) foram adicionados aos tubos. A fluorescência de CD3-FITC e CD19-PE das amostras de sangue foi analisada através de citometria de fluxo ajustando um limiar sobre o CD45-CyChrome. Depleção de células B foi determinada através de plotagem da proporção de células B CD19<sup>+</sup>

para células T CD3<sup>+</sup>.

#### Ligação de anticorpo anti-CD20 à células de Raji

[000316] 200.000 células em 180 µl de tampão FACS (PBS contendo FCS a 2% e EDTA a 5 mM) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 ml. Em seguida, 20 µl de amostras de anticorpo anti-CD20 10 vezes concentradas (concentração final de 1-5000 ng/ml) ou PBS apenas foram adicionados e os tubos foram incubados a 4 °C durante 30 min. Subseqüentemente, amostras foram lavadas duas vezes com tampão FACS e empelotadas a 300 x g durante 30 min. O sobrenadante foi aspirado e as células foram captadas em 100 µl de tampão FACS. Em seguida, 1 µl de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>-FITC anti-Fc-específicos (Jackson Immuno Research Laboratories, EUA) foi adicionado e os tubos foram incubados a 4 °C durante 30 min. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão FACS e captadas em 500 µl de tampão FACS contendo 0,5 µg/ml de PI para análise através de citometria de fluxo. A ligação foi determinada através de plotagem da fluorescência média geométrica contra as concentrações de anticorpo.

#### Exemplo 2

##### Abordagem do Aceitador de Alta Homologia

[000317] A busca pela "*framework*" aceitadora de anticorpo de alta homologia foi realizada através de alinhamento da seqüência de proteína B-ly1 de camundongo a uma coleção de seqüências de linhagem germinativa humana e pegando aquela seqüência humana que mostrou a maior identidade de seqüência. Aqui, a seqüência VH1\_10 (locus 1-e, Ac. No. DP-88) do banco de dados VBase foi escolhida como a seqüência aceitadora de "*framework*" de cadeia pesada e a seqüência IGKV2-40 (Ac. No X59314) do banco de dados MGT foi escolhida como sendo o aceitador de "*framework*" para a cadeia leve. Sobre essas duas *frameworks* aceitadoras, as três

regiões de determinação de complementaridade (CDRs) dos domínios variáveis pesado e leve de camundongo foram enxertadas. Uma vez que a região 4 de *"framework"* não é parte da região variável do gene V de linhagem germinativa, o alinhamento para essa posição foi feito individualmente. A região JH4 foi escolhida para a cadeia pesada e a região JK4 foi escolhida para a cadeia leve. Modelamento molecular do domínio de imunoglobulina projetado revelou um ponto requerendo potencialmente os resíduos de aminoácido de murino em vez daqueles humanos foram da CDR. Re-introdução dos resíduos de aminoácido de murino na *"framework"* humana geraria as assim denominadas re-mutações. Por exemplo, o resíduo de aminoácido aceitador humano na posição 27 de Kabat sofreu remutação para um resíduo de tirosina. Variantes de anticorpo humanizadas foram projetadas, as quais incluíam ou omitiam as re-mutações. A cadeia leve de anticorpo humanizado não requereu quaisquer re-mutações. Após projetar as seqüências de proteína, seqüências de DNA que codificam essas proteínas foram sintetizadas conforme detalhado abaixo.

#### Abordagem de *"framework"* misturada

[000318] De forma a evitar introdução de remutações em posições de resíduo de aminoácido críticas (críticas para reter boa afinidade de ligação a antígeno ou funções de anticorpo) da *"framework"* aceitadora humana, foi investigado se a região de *"framework"* 1 (FR1) inteira ou as regiões de *"framework"* 1 (FR1) e 2 (FR2) juntas, poderiam ser substituídas por seqüências de anticorpo humano já tendo resíduos doadores ou aqueles funcionalmente equivalentes, naquelas posições importantes na seqüência de linhagem germinativa humana natural. Para essa finalidade, as *frameworks* 1 e 2 de VH da seqüência de B-ly1 de camundongo foram alinhadas individualmente às seqüências de linhagem germinativa humanas. Aqui, a maior identidade de seqüência não era importante e não foi usada para escolha das *frameworks*



aceitadoras mas, antes, combinação de vários resíduos críticos foi admitida como sendo mais importante. Esses resíduos críticos compreendem os resíduos 24, 71 e 94 (numeração de Kabat) e também aqueles resíduos nas posições 27, 28 e 30 (numeração de Kabat), os quais repousam fora da definição de CDR1 por Kabat, mas freqüentemente estão envolvidos na ligação a antígeno. A seqüência de IMGT IGHV3-15 (Ac. No X92216) foi escolhida como uma adequada. Após ter projetado as seqüências de proteína, seqüências de DNA que codificam essas proteínas foram sintetizadas conforme detalhado abaixo. Usando essa abordagem, nenhuma remutação foi requerida para a cadeia pesada ou leve, de forma a reter bons níveis de ligação a antígeno.

#### Síntese dos genes de anticorpo

[000319] Após ter projetado a seqüência de aminoácido da região V de anticorpo humanizado, a seqüência de DNA tinha de ser gerada. Os dados de seqüência de DNA das regiões de "*framework*" individuais foram encontrados em bancos de dados para seqüências de linhagem germinativa humana. A seqüência de DNA das regiões de CDR foi tomada dos dados de cDNA de murino correspondentes. Com essas seqüências, a seqüência de DNA inteira foi virtualmente montada. Tendo esses dados de seqüência de DNA, sítios de restrição diagnósticos foram introduzidos na seqüência virtual, através de introdução de mutações silenciosas, criando sítios de reconhecimento para endonucleases de restrição. Para obter a cadeia de DNA física, síntese de gene foi realizada (por exemplo, Wheeler e outros, 1995). Nesse método, oligonucleotídeos são projetados a partir dos genes de interesse, de modo que uma série de oligonucleotídeos são derivados da filamento de codificação e uma outra série é da filamento de não-codificação. As extremidades 5' e 3' de cada oligonucleotídeo (exceto as primeira e última na fileira) sempre mostram seqüências

complementares dos dois iniciadores derivados da filamento oposta. Quando de colocação desses oligonucleotídeos em um tampão de reação adequado para qualquer polimerase estável ao calor e adição de  $Mg^{2+}$ , dNTPs e uma DNA polimerase, cada oligonucleotídeo é estendido a partir de sua extremidade 3'. A extremidade 3' recentemente formada de um iniciador, então, se anela com o próximo iniciador da filamento oposta e estende sua seqüência ainda sob condições adequadas para alongamento de cadeia de DNA *modelo*-dependente. O produto final foi clonado em um vetor convencional para propagação em *E. coli*.

#### Produção de anticorpo

[000320] As seqüências líderes de cadeia pesada e leve humanas (para secreção) foram adicionadas a montante das seqüências de região variável acima e essas foram, então, unidas a montante das seqüências de cadeia pesada e leve constante kapa de IgG1 humana, respectivamente, usando técnicas padrão de biologia molecular. As seqüências de DNA de cadeia pesada e leve de anticorpo completo resultantes foram subclonadas nos vetores de expressão de mamífero (um para a cadeia leve e um para a cadeia pesada) sob o controle do promotor de MPSV e a montante de um sítio poliA sintético, cada vetor trazendo uma seqüência OriP de EBV, conforme descrito no Exemplo 1 acima. Anticorpos foram produzidos conforme descrito no Exemplo 1 acima, isto é, através de co-transfecção de HEK293-EBNA com os vetores de expressão de cadeia pesada e leve de anticorpo de mamífero, coletando o meio de cultura condicionado 5 a 7 dias pós-transfecção e purificando os anticorpos selecionados através de cromatografia por afinidade de Proteína A, seguido por cromatografia de troca de cátions e uma etapa de cromatografia por exclusão de tamanho final para isolar anticorpos de IgG1 monoméricos puros. Os anticorpos foram formulados em uma solução de fosfato de potássio a

25 mM, cloreto de sódio a 125 mM, solução de glicina a 100 mM, pG de 6,7. Variantes glico-manipuladas das variantes de anticorpo humanizadas foram produzidas através de co-transfecção dos vetores de expressão de anticorpo com um vetor de expressão de glicosiltransferase GnTIII ou junto com um vetor de expressão de GnTIII mais um vetor de expressão de manosidase II de Golgi, conforme descrito para o anticorpo quimérico no Exemplo 1 acima. Anticorpos glico-manipulados foram purificados e formulados conforme descrito acima para os anticorpos não-glico-manipulados. Os oligossacarídeos presos à região Fc dos anticorpos foram analisados através de MALDI/TOF-MS, conforme descrito abaixo.

#### Análise de oligossacarídeo

[000321] O método de liberação de oligossacarídeo para anticorpos em solução. Entre 40 e 50 µg de anticorpo foram misturados com 2,5 mU de PNGaseF (Glyko, E.U.A.) em Tris a 2 mM, pH de 7,0, em um volume final de 25 microlitros e a mistura foi incubada durante 3 horas a 37 °C.

#### Preparação de amostra para MALDI/TOF-MS

As digestões enzimáticas contendo os oligossacarídeos liberados foram incubadas durante mais 3 h em temperatura ambiente após a adição de ácido acético até uma concentração final de 150 mM e foram subsequenteiramente passadas através de 0,6 ml de resina de troca de cátions (resina AG50W-X8, forma de hidrogênio, malha 100-200, BioRad, Suíça) acondicionada em uma coluna de cromatografia Micro-bio-spin (BioRad, suíça) para remover os cátions e proteínas. Um microlitro da amostra resultante foi aplicado a uma lâmina-alvo de aço inoxidável e misturado, sobre a lâmina, com 1 µl de matriz sDHB. A matriz sDHB foi preparada através de dissolução de 2 mg de ácido 2,5-diidroxibenzóico mais 0,1 mg de ácido 5-metóxi-salicílico em 1 ml de etanol/cloreto de sódio aquoso a 10 mM a 1:1 (v/v). As amostras

foram secas ao ar, 0,2 µl de etanol foram aplicados e as amostras foram finalmente deixadas re-cristalizar sob ar.

#### MALDI/TOF-MS

[000322] O espectrômetro de massa para MALDI-TOF usado para adquirir os espectros de massa era um Voyager Elite (Perspective Biosystems). O instrumento foi operado na configuração linear, com uma aceleração de 20 kV e retardo de 80 ns. Calibração externa usando padrões de oligossacarídeo foi usada para atribuição de massa dos íons. Os espectros de 200 pontos de laser foram resumidos para obter o espectro final.

#### Ensaio de ligação a antígeno

[000323] As variantes de anticorpo humanizado monoméricas purificadas foram testadas com relação à ligação a CD20 humano sobre células B alvo de linfoma de Raji usando um ensaio baseado em citometria de fluxo, conforme descrito para o anticorpo B-ly1 quimérico no Exemplo 1, acima.

#### Ligação de glicovariantes de IgG1 monoméricas à células NK e a linhagem de células CHO expressando FcγRIIIA

[000324] Células NK humanas foram isoladas de células mononucleares de sangue periférico recentemente isoladas (PBMC) aplicando um enriquecimento de seleção negativa para células CD16- e CD56-positivas (sistema MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Alemanha). A pureza determinada através de expressão de CD56 estava entre 88-95%. Células NK recentemente isoladas foram incubadas em PBS sem íons de cálcio e magnésio ( $3 \times 10^5$  células/ml) durante 20 minutos a 37 °C para remover a IgG associada à células NK. As células foram incubadas a  $10^6$  células/ml em diferentes concentrações de anticorpo anti-CD20 (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 µg/ml) em PBS, BSA a 0,1%. Após várias lavagens, a ligação de anticorpo foi detectada através de incubação com IgG F(ab')<sub>2</sub>-específica anti-

humana de F(ab')<sub>2</sub> de cabra FITC-conjugada a 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA/EUA) e CD56-PE anti-humano (BD Biosciences, Allschwil/Suíça). Os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-Fcγ<sub>3</sub> 3G8 (Ancell, Bayport, MN/EUA) foram adicionados em uma concentração de 10 µg/ml para competir com a ligação de glicovariantes de anticorpo (3 µl/ml). A intensidade de fluorescência relativa às variantes de anticorpo ligadas foi determinada para células CD56-positivas sobre um FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Suíça). Células CHO foram transfectadas através de eletroporação (280 V, 950 µF, 0,4 cm) com um vetor de expressão que codifica a cadeia α e a cadeia γ de Fcγ<sub>3</sub>-Val158. Transfectantes foram selecionados através da adição de 6 µg/ml de puomicina e clones estáveis foram analisados através de FACS usando 10 µl de anticorpo monoclonal anti-Fcγ<sub>3</sub> 3G8 FITC-conjugado (BD Biosciences, Allschwil/Suíça) para 10<sup>6</sup> células. Ligação de IgG1 à células CHO expressando Fcγ<sub>3</sub>-Val158 foi realizada analogamente à ligação de células NK descrita acima.

#### Ensaio de ADCC

[000325] Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foram usadas como células efetadoras e foram preparadas usando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 EUA) e seguindo essencialmente as instruções do fabricante. Em resumo, sangue venoso foi tirado com seringas heparinizadas de voluntários. O sangue foi diluído a 1:0,75-1,3 com PBS (não contendo Ca<sup>++</sup> ou Mg<sup>++</sup>) e colocado em camadas sobre Histopaque-1077. O gradiente foi centrifugado a 400 x g durante 30 min em temperatura ambiente (RT) sem pausas. A interfase contendo a PBMC foi coletada e lavada com PBS (50 ml por célula a partir de dois gradientes) e coletada através de centrifugação a 300 x g durante 10 minutos em RT. Após ressuspensão do pélete com PBS, as PBMCs foram

contadas e lavadas uma segunda vez através de centrifugação a 200 x g durante 10 minutos em RT. As células foram, então, ressuspensas no meio apropriado para os procedimentos subseqüentes.

[000326] A proporção de efetuidor para alvo usada para os ensaios de ADCC foi de 25:1 e 10:1 para células PBMC e NK, respectivamente. As células efetuidoras foram preparadas em meio ADVI-V na concentração apropriada de forma a adicionar 50 µl por cavidade de lâminas com 96 cavidades de fundo redondo. As células-alvo eram células de linfoma B humano (por exemplo, células Raji) crescidas em DMEM contendo FCS a 10%. Células alvo foram lavadas em PBS, contadas e re-suspensas em AIM-V a 0,3 milhões por ml de forma a adicionar 30.000 células em 100 µl por microcavidade. Os anticorpos foram diluídos em AIM-V, adicionados em 50 µl às células-alvo pré-colocadas em lâminas e deixados se ligar aos alvos durante 10 minutos em RT. Então, as células efetuidoras foram adicionadas e a lâmina foi incubada durante 4 horas a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Morte de células-alvo foi avaliada através de medição de liberação de desidrogenase de lactato (LDH) de células danificadas usando o kit de Detecção de Citotoxicidade (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suíça). Após a incubação de 4 horas, as lâminas foram centrifugadas a 800 x g. 100 µl de sobrenadante de cada cavidade foram transferidos para uma nova lâmina com 96 cavidades de fundo plano transparente. 100 µl de tampão de substrato colorido do kit foram adicionados por cavidade. Os valores de  $V_{max}$  da reação colorida foram determinados em um leitor ELISA a 490 nm durante pelo menos 10 min usando o software SOFTmax PRO software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, EUA). A liberação espontânea de LDH foi medida a partir de cavidades contendo apenas células-alvo e efetuidoras, mas nenhum anticorpo. A liberação máxima foi determinada a partir de cavidades contendo apenas

células-alvo e Triton X-100 a 1%. O percentual de morte anticorpo-mediada específica foi calculado como segue:  $((x - SR)/(MR - SR) * 100$ , onde x é a média da  $V_{max}$  em uma concentração específica, SR é a média de  $V_{max}$  da liberação espontânea e MR é a média de  $V_{max}$  da liberação máxima.

#### Ensaio de citotoxicidade complemento-dependente

[000327] Células alvo foram contadas, lavadas com PBS, ressuspensas em AIM-V (Invitrogen) a 1 milhão de células por ml. 50 µl de células foram colocados por cavidade em uma lâmina de fundo plano com 96 cavidades. Diluições de anticorpo foram preparadas em AIM-V e adicionadas em 50 µl às células. Anticorpos foram deixados se ligar às células durante 10 minutos em temperatura ambiente. Complemento de soro humano (Quidel) foi recentemente descongelado, diluído 3 vezes com AIM-V e adicionado em 50 µl às cavidades. Complemento de coelho (Cedarlane Laboratories) foi preparado conforme descrito pelo fabricante, diluído 3 vezes com AIM-V e adicionado em 50 µl às cavidades. Como um controle, fontes de complemento foram aquecidas durante 30 min a 56 °C antes de adição ao ensaio. As lâminas de ensaio foram incubadas durante 2 horas a 37 °C. Morte de células foi determinada medindo a liberação de LDH. Resumidamente, as lâminas foram centrifugadas a 300 x g durante 3 min. 50 µl de sobrenadante por cavidade foram transferidos para uma nova lâmina com 96 cavidades e 50 µl do reagente de ensaio do Kit Cytotoxicity (Roche) foram adicionados. Uma medição cinética com o leitor ELISA determinou a  $V_{max}$  correspondente à concentração de LDH no sobrenadante. A liberação máxima foi determinada através de incubação das células na presença de Triton X-100 a 1%.

#### Ensaio de depleção de células B em todo o sangue

[000328] Depleção de células B normais em todo o sangue pelos anticorpos anti-CD20 foi realizada conforme descrita no Exemplo 1

acima.

#### Ensaio de apoptose

[000329] A potência apoptótica dos anticorpos foi avaliada através de incubação do anticorpo a 10 µg/ml (condições de saturação com relação à ligação ao antígeno) com as células-alvo (em uma concentração de células-alvo de  $5 \times 10^5$  células/ml) durante a noite (16-24 h). Amostras foram coradas com AnnV-FITC e analisadas através de FACS. O ensaio foi feito em triplicatas.

[000330] Detecção é realizada através de citometria de fluxo acompanhando o aparecimento de marcadores apoptóticos, tais como anexina V e fosfatidil serina. Controle negativo (sem apoptose induzida) não contém qualquer anticorpo, mas apenas solução salina tamponada com fosfato. Controle positivo (apoptose máxima) contém 5 micromolar do indutor forte de apoptose Camptotecina (CPYT).

#### Resultados e Discussão

[000331] Comparação da ligação de antígeno CD20 humano de variantes de anticorpo B-HH1, B-HH2, B-HH3, em complexo com a cadeia leve de B-ly1 humanizado (BKV1) e o anticorpo quimérico precursor chB-ly1 (descrito no Exemplo 1 acima) mostra que todos os anticorpos têm um valor de EC50 similar, mas a estrutura B-HH1 se liga com uma intensidade/estequiometria menor do que as variantes B-HH2 e B-HH3 (figura 11). B-HH1 pode ser distinguida da B-HH2 e B-HH3 por suas regiões de CDR1 e CDR2 parciais (definição de Kabat), bem como o polimorfismo Ala/Thr na posição 28 (numeração de Kabat). Isso indica que a posição 28, a CDR1 completa e/ou a CDR2 completa são importantes para interação anticorpo/antígeno.

[000332] A comparação de B-HL1, B-HH1 e o anticorpo precursor chB-ly1 quimérico mostrou ausência de qualquer atividade de ligação na estrutura B-HL1 e cerca de metade de intensidade de ligação/estequiometria da B-HH1 comparado com o B-ly1 (figura 12). A



B-HL1, bem como B-HH1 são projetadas baseado em *frameworks* aceitadoras derivadas da classe VH1 humana. Entre outras diferenças, a posição 71 (numeração de Kabat) da estrutura B-HL1 é uma diferença marcante, indicando sua importância putativa para a ligação a antígeno. O aminoácido na posição 71 é um dos resíduos que determina a estrutura em loop canônica da CDR2 da cadeia pesada. Aqui, alanina ou um equivalente funcional da mesma (por exemplo, leucina, valina ou treonina (vide, por exemplo, Morea e outros, *Methods* 20: 267-279 (2000)) parece ser importante para a ligação a antígeno, enquanto que a arginina parece ser prejudicial para a ligação a antígeno.

[000333] Quando de comparação dos dados de ligação a antígeno das Figuras 2 e 9, as variantes BHH2-BKV1, BHL8-BKV1 e BHL1-BKV1 mostram boa afinidade de ligação, dentre as diferentes variantes de anticorpo humanizado testadas, ao CD20 humano sobre a superfície de células humanas. Apesar de valores de EC50 similares para ligação a antígeno, essas variantes diferem fortemente quando a seu comportamento de induzir à apoptose em células-alvo CD20 positivas (vide Figuras 4-6, 14, 15). Uma vez que o anticorpo B-ly1 original mostrou baixa indução de apoptose, os presentes inventores determinaram as diferenças entre a estrutura do anticorpo B-ly1 precursor e as estruturas B-HL8 e B-HH2. Sete resíduos foram identificados na cadeia pesada da B-HH2 que não estavam presentes nas cadeias pesadas da B-HL8 ou do B-ly1 precursor: Gln1, Ala9, Val11, Lys12, Ser16, Val20 e Met48. Todos os sete desses resíduos estão localizados nas regiões de "*framework*" do domínio VH. A probabilidade de contato direto com antígeno era improvável, exceto para Gln1. Para determinar se um único desses resíduos sozinho era responsável pela propriedade de indução de apoptose recentemente gerada, sete variantes da cadeia pesada de B-HH8 foram geradas,

que poderiam restaurar potencialmente o comportamento apoptótico da estrutura B-HH2: B-HL11 (tendo a mutação E1Q), B-HL1 (G9A, V48M), B-HL13 (L1 IV, V48M), B-HL14 (V12K, V48M), B-HL15 (G16S, V48M), B-HL16 (L20V, V48M) e B-HL17 (V48M). Vide SEQ ID NOs: 32, 34, 36, 38, 40, 42 e 44 (as quais, conforme apresentado na Listagem de Seqüência, não são numeradas de acordo com Kabat, mas cuja numeração de Kabat pode ser prontamente determinada por aqueles versados na técnica). As propriedades de ligação a antígeno dessas variantes não diferem drasticamente com relação aos valores de EC50 e estequiometria (vide figura 2). Contudo, uma diferença pronunciada pode ser encontrada em sua capacidade de induzir à apoptose (Figuras 4-6, 14, 15 e 24). A estrutura com as modificações L11V, V48M, B-HL12, aumentou significativamente a capacidade de induzir à apoptose (vide figura 24). A modificação V48M, sozinha, contudo, não tem um efeito visível (vide figura 5). Conseqüentemente, os resíduos nas posições 11 e 12 de Kabat influenciaram o comportamento apoptótico até grande ponto. Esses resíduos não afetam a ligação a antígeno diretamente, mas antes influenciam a interface entre os domínios VH e CH1 e, assim, atuam via uma modificação do ângulo de cotovelo.

[000334] A estrutura B-HL4 é derivada do anticorpo B-HH2 através de substituição da FR1 da B-HH2 por aquele da seqüência de linhagem germinativa humana IGHV1-45 (Ac. No X92209). Essa estrutura mostra capacidade de ligação a antígeno grandemente diminuída, a despeito de ter diferentes aminoácidos em apenas quatro posições dentro da FR1. Esses resíduos estão localizados nas posições 2, 14, 28 e 30 (numeração de Kabat). Dessas, as posições 28 e 30 puderam estar em uma posição de influência, uma vez que elas são parte da definição de Chothia de CDR1. Em variantes B-HH8 e 9 (com a cadeia leve BKV1), as posições 28 e 30 são modificadas

comparado com a sequência do B-ly1 precursor. Conforme observado na figura 22, a propriedade de ligação não sofre significativamente se treonina 28 ou treonina 30 estão presentes (figura 22). Nenhuma remutação foi introduzida na cadeia leve humanizada, a qual tinha as CDR1, CDR2 e CDR3 de Kabat completas enxertadas. Na indução de apoptose (vide Figuras 14, 15 e 21), a variante mais potente era a variante de B-ly1 humanizada BHH2-BKV1 (ainda mais potente do que o chB-ly1 original e muito mais potente do que um anticorpo com uma sequência idêntica ao rituximab, C2B8). Outras variantes humanizadas que podem recuperar a apoptose aumentada são: B-HL13 e B-HL14 (derivadas de BHL8), BHH8 ("framework" misturada), BHH9 ("framework" misturada" com uma remutação para examinar o efeito de S30T) e B-HH6 (derivado M34I de B-HH2). A variante BHH4 é outra variante de B-ly1 humanizada que não introduz quaisquer seqüências não-humanas adicionais. As variantes B-HH5, B-HH6 e B-HH7 são derivados da estrutura B-HH2 com uma região CDR1 de Kabat parcialmente humanizada.

[000335] Propriedades importantes do anticorpo B-ly1 humanizado são que ele é um tipo de anticorpo anti-CD20 conforme definido em Cragg, M.S. e Glennie, MJ., *Blood* 103(7): 2738-2743 (Abril de 2004). Portanto, ele não induz, quando de ligação ao CD20, a qualquer resistência significativa na extração com detergente não-iônico de CD20 da superfície de células humanas CD20<sup>+</sup>, usando o ensaio descrito para essa finalidade em Polyak, MJ. e Deans, J.P., *Blood* 99(9): 3256-3262 (2002). Ele induziu a significativamente menos resistência à extração com detergente não-iônico de CD20 do que o anticorpo C2B8 (outro anticorpo anti-CD20 com uma sequência idêntica ao rituximab (vide Pub. de Patente U.S. No. 2003 0003097 para Ref.)). Conforme esperado de um anticorpo anti-CD20 do tipo II, o B-ly1 humanizado não tem qualquer atividade de lise complemento-

mediada significativa e mostrou uma atividade de lise complemento-mediada muito menor do que o anticorpo anti-CD20 C2B8 (IgG1 quimérica com seqüência idêntica ao rituximab). Outra propriedade importante do anticorpo B-ly1 humanizado (variante B-HH2 B-KV1) era que ele é muito potente no ensaio de agregação homotípica. Nesse ensaio, células humanas CD20-positivas, células Daudi, foram incubadas em meio de cultura de célula durante até 24 horas a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em uma incubadora de células de mamífero, conforme descrito em detalhes em Deans e outros, com o anticorpo em uma concentração de 1 micrograma por ml e, em paralelo, em uma concentração de 5 microgramas por ml. Como uma comparação, incubação de controle paralela das células foi realizada sob condições idênticas usando o anticorpo anti-CD20 C2B8. Em diferentes pontos de tempo, incluindo 8 horas e 24 horas de incubação, as células foram inspecionadas visualmente usando um microscópio. Descobriu-se que o anticorpo B-ly1 humanizado levou a uma forte agregação homotípica, com agregados sendo significativamente maiores do que aqueles induzidos através da adição do anticorpo de controle C2B8. Além disso e consistente com o anticorpo sendo um anticorpo anti-CD20 do tipo II, ele induziu a níveis maiores de apoptose quando células humanas CD20-positivas foram incubadas com o anticorpo B-ly1 humanizado, com relação a um controle sob condições idênticas usando o anticorpo de IgG1 C2B8 quimérico com seqüência idêntica ao rituximab.

[000336] Variantes glico-manipuladas dos anticorpos humanizados foram produzidas através de co-expressão de glicosiltransferase GnTIII, junto com os genes de anticorpo, em células de mamífero. Isso levou a um aumento na fração de oligossacarídeos não fucosilados presos à região Fc dos anticorpos, incluindo oligossacarídeos não fucosilados bisseccionados, conforme tinha sido descrito no WO

2004/065540 (Figuras 17-19). Os anticorpos glico-manipulados tinham níveis significativamente maiores de ligação aos receptores FcγRIII humanos (figura 20) e uma maior atividade de ADCC também (figura 16) com relação ao anticorpo não glico-manipulado e com relação ao anticorpo C2B8. O anticorpo humanizado B-ly1 também era mais potente na indução de depleção de células B humanas em um ensaio com todo o sangue (figura 16) do que o anticorpo de controle C2B8. Isso era verdadeiro para o anticorpo B-ly1 não glico-manipulado e para a versão glico-manipulada do mesmo. O anticorpo glico-manipulado era aproximadamente 1000 vezes mais potente do que o anticorpo anti-CD20 de controle C2B8 na depleção de células B no ensaio com todo o sangue. Essa comparação é importante para as formas humanizadas não glico-manipuladas e glico-manipuladas de anticorpo B-ly1, porque ela mostrou que, em ensaios, as atividades dependentes de receptor Fc combinadas, tal como ADCC, mais lise complemento-mediada, mais indução de apoptose, ambas as formas de B-ly1 eram significativamente mais potentes do que o C2B8, embora ambas as formas de B-ly1 tenham atividade de lise complemento-mediada dramaticamente menor. As atividades de morte celular receptor Fc-dependente, ADCC e indução de apoptose foram apresentadas nessa atividade superior das variantes de anticorpo B-ly1 humanizado. Além disso, no ensaio de apoptose, as formas não glico-manipuladas e glico-manipuladas desse anticorpo anti-CD20 do tipo II eram potentes, com as variantes Fc-manipuladas com afinidade de ligação aumentada aos receptores Fcγ sendo ainda mais potentes na indução de apoptose do que a variante não-Fc-manipulada e com todas as variantes sendo significativamente mais potentes do que o anticorpo de controle C2B8. O mecanismo exato para agregação homotípica intensificada e indução de apoptose mediada pelos anticorpos anti-CD20 do tipo II

não é conhecido e ligação concomitante à outras moléculas sobre a superfície de células CD20-positivas, tais como receptores Fc gama, pode influenciar essa propriedade importante. Portanto, foi importante demonstrar que anticorpos anti-CD20 do tipo II que tinham sido manipulados em sua região Fc para afinidade de ligação aumentada a receptores Fc gama, incluindo FcgamaRIII e com um aumento associado na atividade de ADCC, ainda eram capazes de induzir à forte apoptose, mesmo mais do que a agregação homotípica e não-Fc-manipulada. Indução de apoptose é importante uma vez que, *in vivo*, existem locais no corpo onde as células CD20-positivas alvo podem ser encontradas, mas onde acesso à células FcgamaRIII-positivas é mais difícil do que no sangue (por exemplo, nódulos linfáticos). Nesse locais, a indução de apoptose pelo anticorpo anti-CD20, em si, pode ser crucial para a boa eficácia da terapia com anticorpo anti-CD20 em seres humanos, para o tratamento de malignidades hematológicas, tais como linfomas não-Hodgkin e leucemia linfocítica crônica de células B e para o tratamento de doenças auto-imunes, tais como artrite reumatóide e lúpus, via uma abordagem de depleção de células B. A afinidade de ligação aumentada ao FcgamaRIII e maior ADCC do anticorpo anti-CD20 do tipo II Fc-manipulado humanizado pode também ser um atributo muito importante para tais terapias. Finalmente, a atividade de lise complemento-mediada reduzida ou negligenciável desse anticorpo anti-CD20 do tipo II, incluindo variantes humanizadas e Fc-manipuladas, também pode ser importante, uma vez que maior ativação de complemento por anticorpos anti-CD20 foi correlacionada com efeitos colaterais indesejáveis aumentados.

### Exemplo 3

[000337] Para examinar adicionalmente resíduos que influenciam a atividade apoptótica, seis variantes da cadeia pesada de BHH2 foram geradas: BHH2-A (V11L) (SEQ ID NO: 124), BHH2-B (K12V) (SEQ ID

NO: 125), BHH2-C (A9G) (SEQ ID NO: 126), BHH2-D (E10G) (SEQ ID NO: 127), BHH2-E (T1101) (SEQ ID NO: 128) e BHH2-F (S1121) (SEQ ID NO: 129). Essas estruturas variantes foram testadas com relação à ligação a um antígeno-alvo (CD20) através dos métodos descritos aqui acima. Todas as seis estruturas variantes retiveram a atividade de ligação.

[000338] Essas estruturas variantes de cadeia pesada também foram testadas com relação ao efeito apoptótico através de métodos descritos aqui acima. Cinco das estruturas, BHH2-B, BHH2-C, BHH2-D, BHH-2E e BHH-2F, tinham o mesmo potencial apoptótico que a estrutura precursora BHH2. Contudo, a capacidade da BHH2-A (V11L) de induzir à apoptose era significativamente diminuída em comparação com a BHH2 (vide figura 23).

[000339] O efeito apoptótico de substituições de um único aminoácido na cadeia leve do B-ly1 humanizado (BKV1) também foi examinado através da geração de cinco variantes: BKV-10 (P40A) (SEQ ID NO: 130), BKV-11 (A80P) (SEQ ED NO: 131), BKV-12 (V83F) (SEQ ID NO: 132), BKV-13 (E105A) (SEQ ID NO: 133) e BKV-14 (I106A) (SEQ ID NO: 134). As estruturas BKV-11, BKV-12, BKV-13 e BKV-14 foram testadas com relação à ligação ao antígeno-alvo (CD20) através dos métodos descritos aqui acima e foi determinado que todas as quatro retinham a atividade de ligação. Essas quatro estruturas variantes de cadeia leve também foram testadas com relação ao efeito apoptótico através dos métodos descritos aqui acima. O potencial apoptótico da BKV-11, BKV-12 e BKV-13 não foi alterado por suas respectivas substituições. Contudo, a BKV-14 demonstrou uma capacidade reduzida de induzir à apoptose em comparação com a BKV1 (vide, por exemplo, figura 25).

[000340] Todas as publicações, tais como livros texto, artigos de jornal, entradas no GenBank e pedidos e pedidos de patente

publicados mencionados no presente relatório descritivo são aqui incorporados por referência até o mesmo ponto como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado como sendo incorporado por referência.



## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-CD20, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 128 e um segundo polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 48;

(b) um primeiro polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 129 e um segundo polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 48; ou

(c) um primeiro polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 12 e um segundo polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 134,

em que o referido anticorpo induz níveis mais elevados de apoptose quando complexada com CD20 em comparação com quando o anticorpo B-Ly1 quimérico é complexado com CD20.

2. Anticorpo , de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região Fc humana.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a referida região Fc foi modificada para ter uma proporção diminuída de resíduos de fucose comparado com uma região Fc não-modificada.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a referida região Fc foi modificada para ter uma proporção aumentada de resíduos de GlcNAc para resíduos de fucose comparado com uma região Fc não-modificada.

5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3 ou 4,

caracterizado pelo fato de que pelo menos 20% dos oligossacarídeos modificados na região Fc são bisseccionados, não fucosilados.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos 50% dos oligossacarídeos modificados na região Fc são não fucosilados.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

8. Uso do anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratar linfoma de células B, linfoma não-Hodgkin ou leucemia linfocítica crônica de células B.

9. Uso do anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratar artrite reumatóide ou lúpus.

## FIG.1

1F5-VH	1	QVQLRQPGAEILVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL
B9E9-VH	1	.....V.G.....
C2B8-VH	1	.....O.....
2H7-VH	1	..AY.O.S.....R.....R.....
B-ly1-VH	1	..E.K.Q.S.....A.SYSW.N.....R.E.D.....D.G.....R.E.....
2F2-VH	1	..E.....VTS.CG.O..P.LRL..A..A..NU.A..P.A.A..K..VST.SWNS.SIG.ADSV..R.E.....
7D8-VH	1	..E.....VTS.CG.O..P.LRL..A..A..HD.A..P.A.A..K..VST.SWNS.TIG.ADSV..R.E.....
11B8-VH	1	..E.....V.S.CG..H.G.LRL..FG..E..SYHA.....R.A.A..K..VST.GI..V.Y.ADSV..R.E.....
1F5-VH	71	TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS-HYGS-NYDYF---DYWGQGILVTVST
B9E9-VH	71	.....A-QLPP..W.....V.....A.....
C2B8-VH	71	.....TM..G.DN---NM.....A.....
2H7-VH	71	..M.....V.V.Y..SYW.....V.....
B-ly1-VH	71	.....N.....N.VFDG..YWIY---P.....A.....
2F2-VH	71	SR.NAKNST..L.MN..RA..L.LL..KD..IQYQ..YYGN---V.....S.....
7D8-VH	71	SR.NAKNST..L.MN..RA..L.LL..KD..IQYQ..YYGM---V.....S.....
11B8-VH	71	SR.NVKNST..L.MN..RA..M.....D.Y..AGSTY.GIYGM.V.....S.....

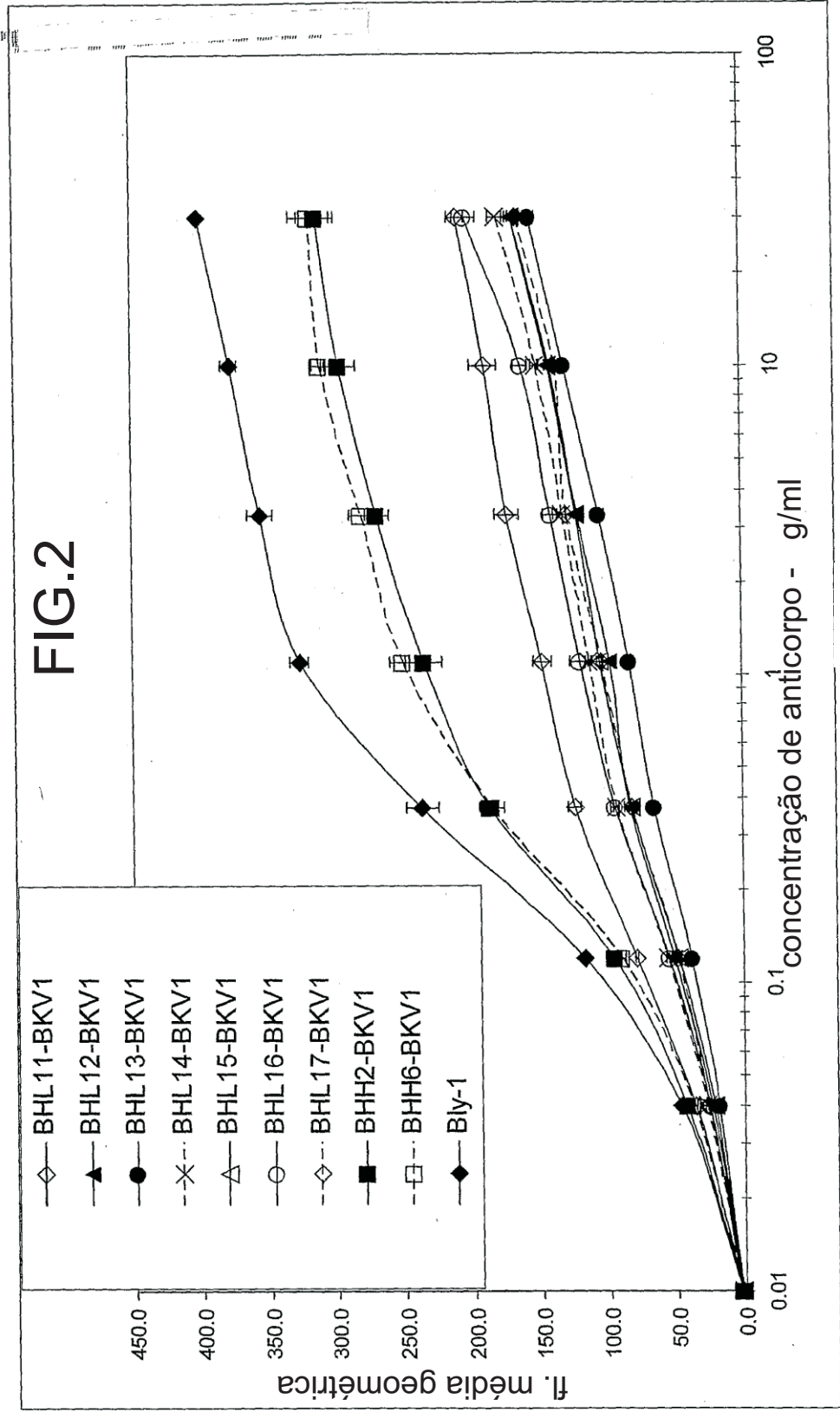


FIG.3

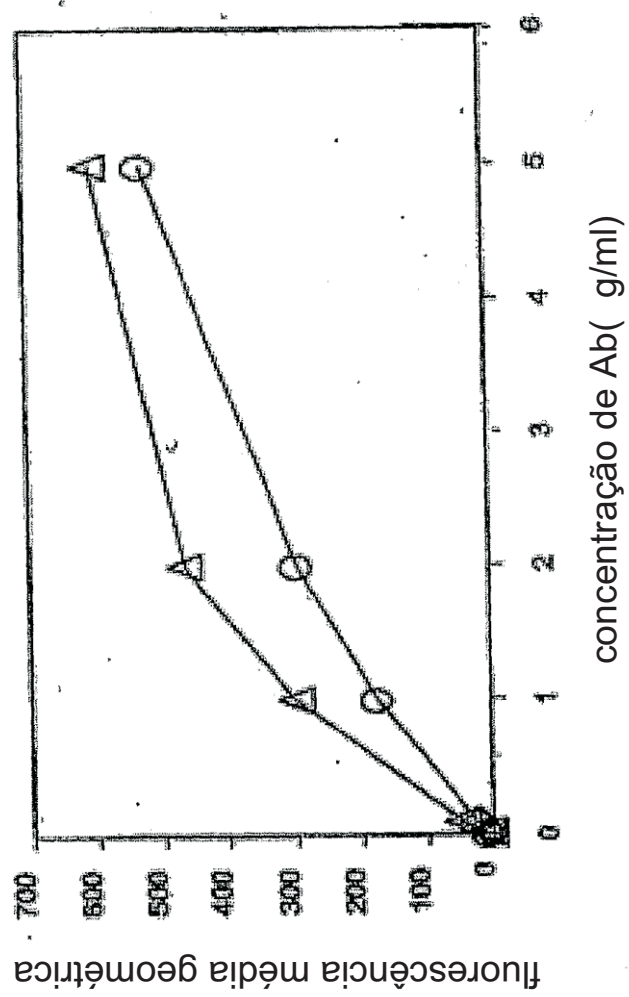


FIG.4

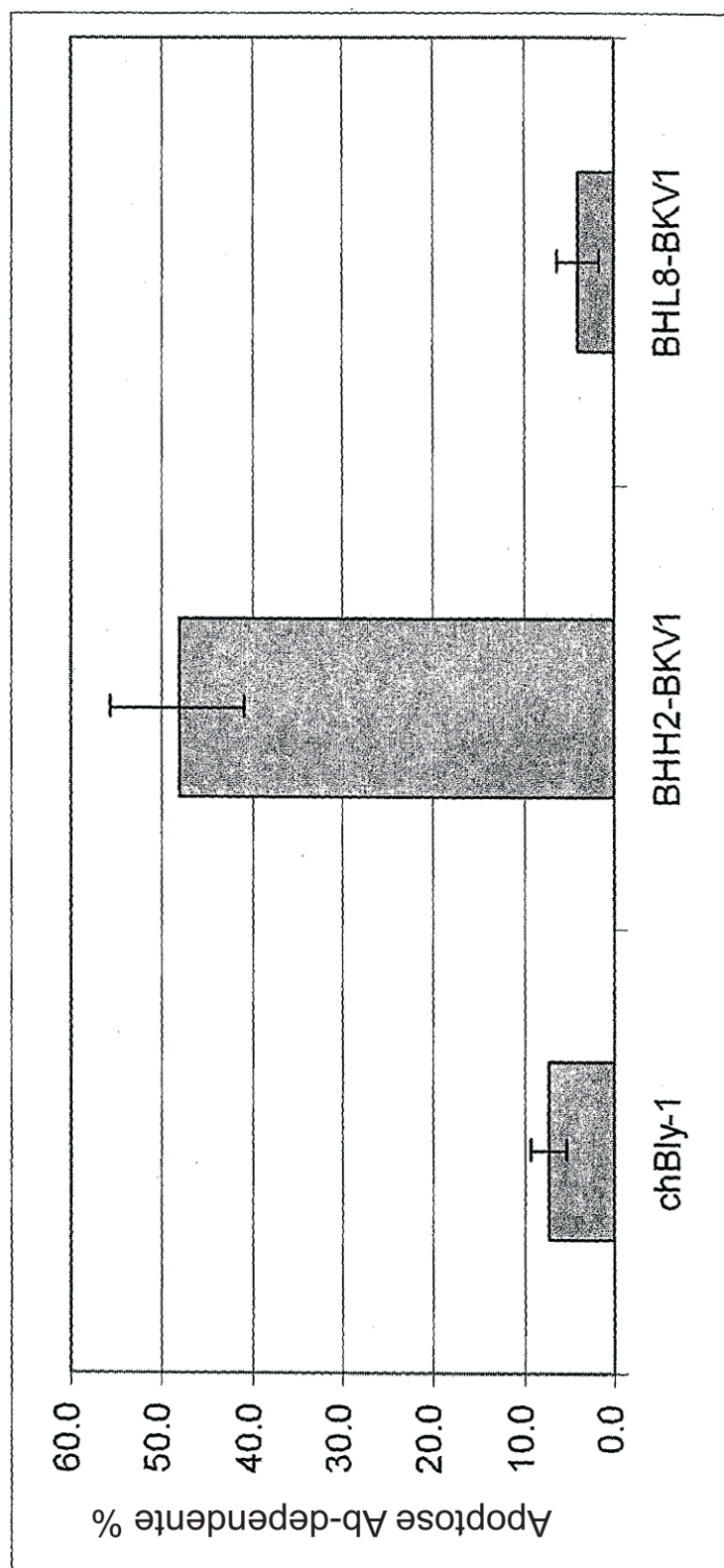


FIG.5

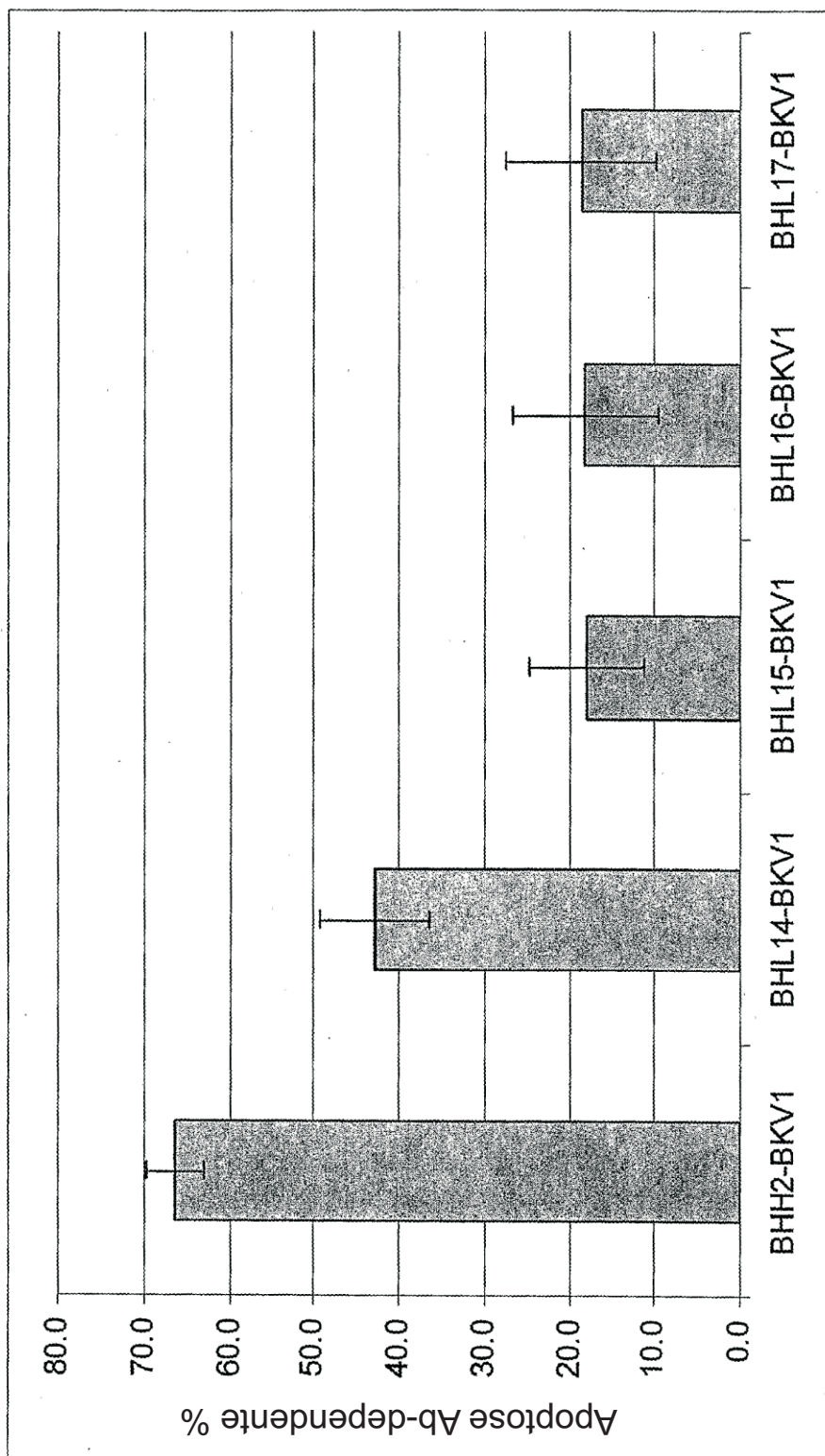


FIG.6

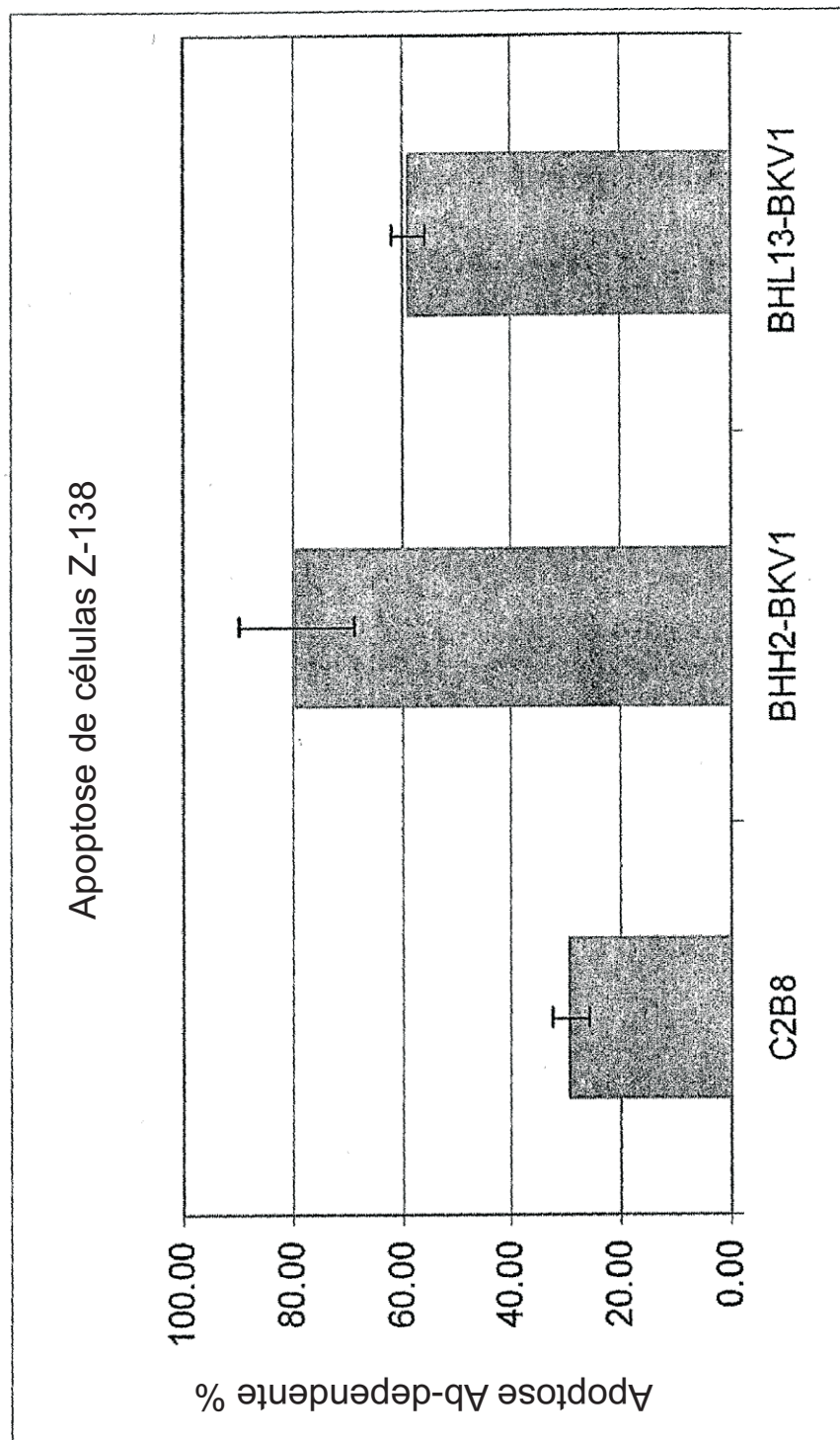




FIG.7

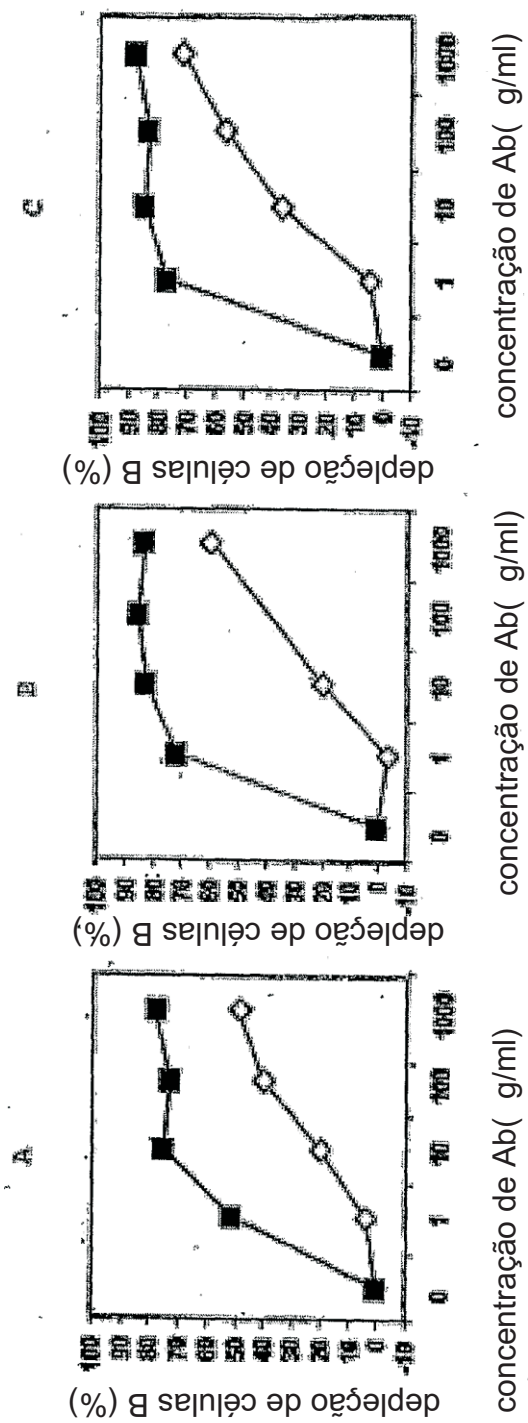


FIG.8A

Percentual relativo

	+ EndoH		
	Bly-1 m1	Bly-1 m1	
	031024	031024	
	016	017	
1053			
1256			
1282			
1298			3.70%
1339	18.60%		17.90%
1460			4.30%
1486	5.90%		5.50%
1502	5.10%		3.70%
1543	35.00%		39.20%
1622			
1647	4.60%		3.00%
1664	7%		
1680			
1688	11.00%		10.30%
1705	7.20%		7.30%
1810			
1826			
1850	5.90%		5.20%
1972			
2012			
	100%		100%

9/28

FIG.8B

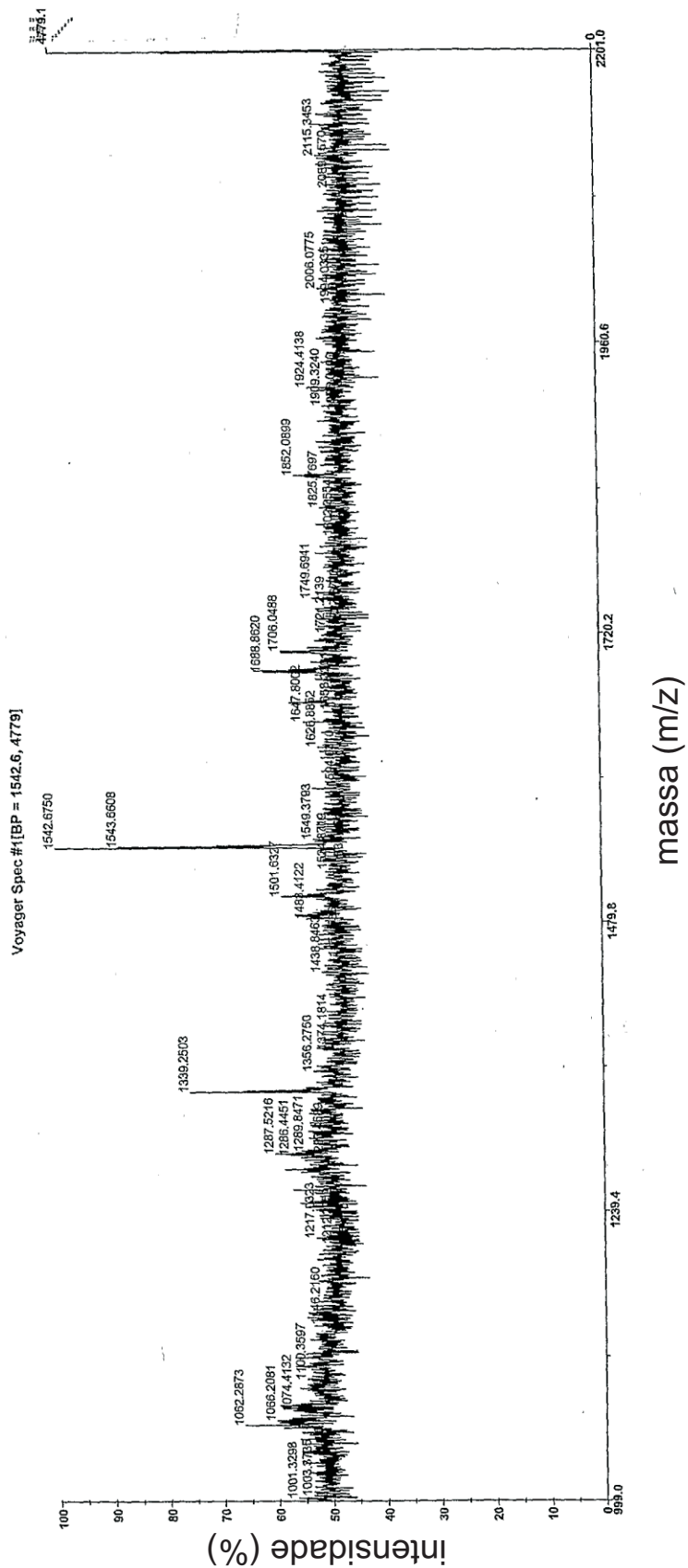


FIG.8C

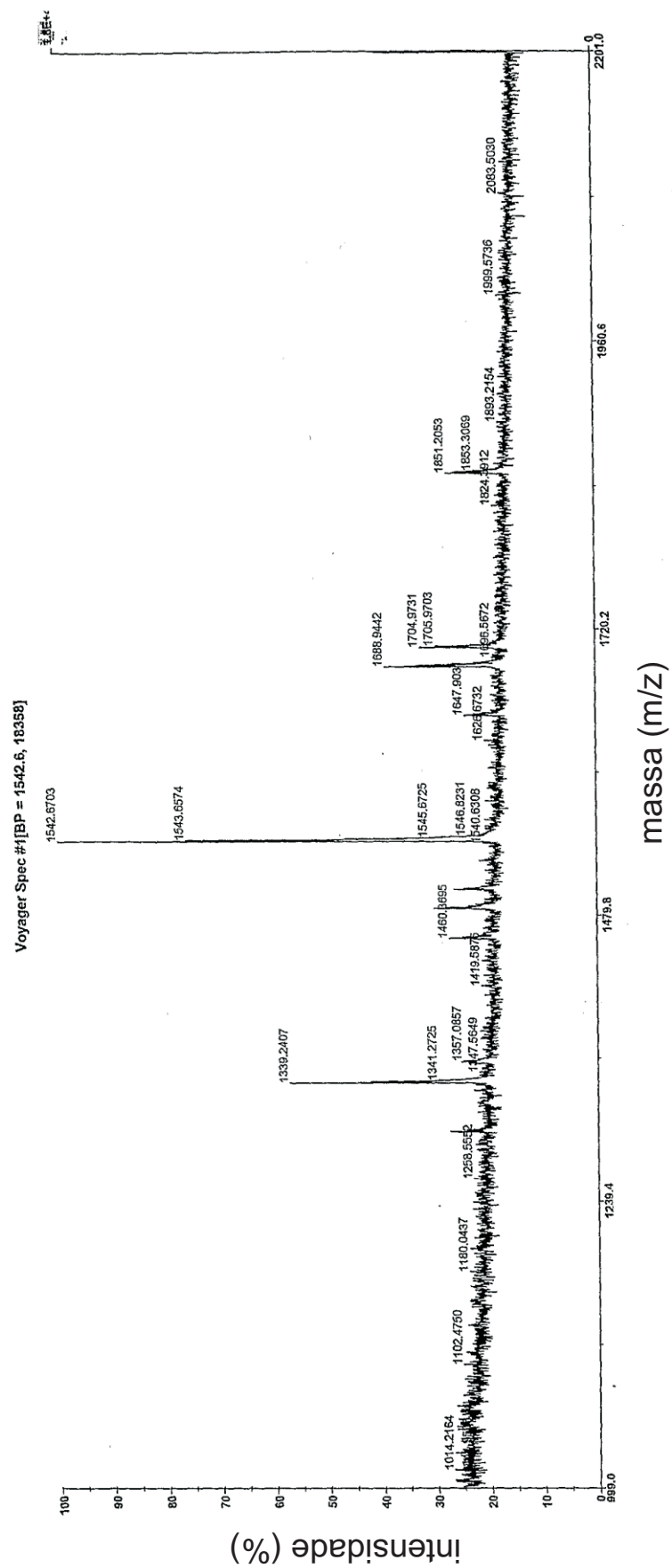


FIG.9

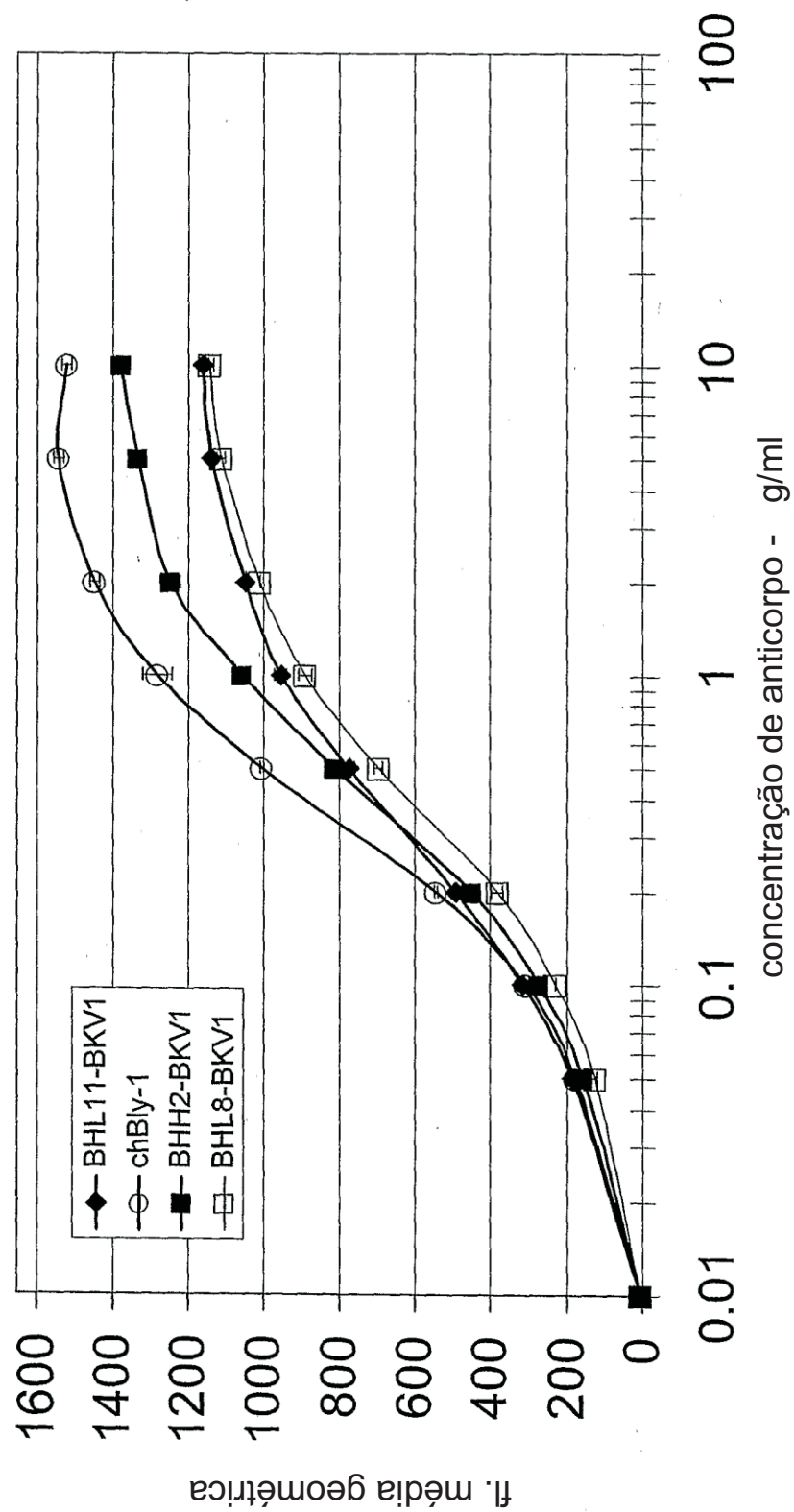


FIG.10

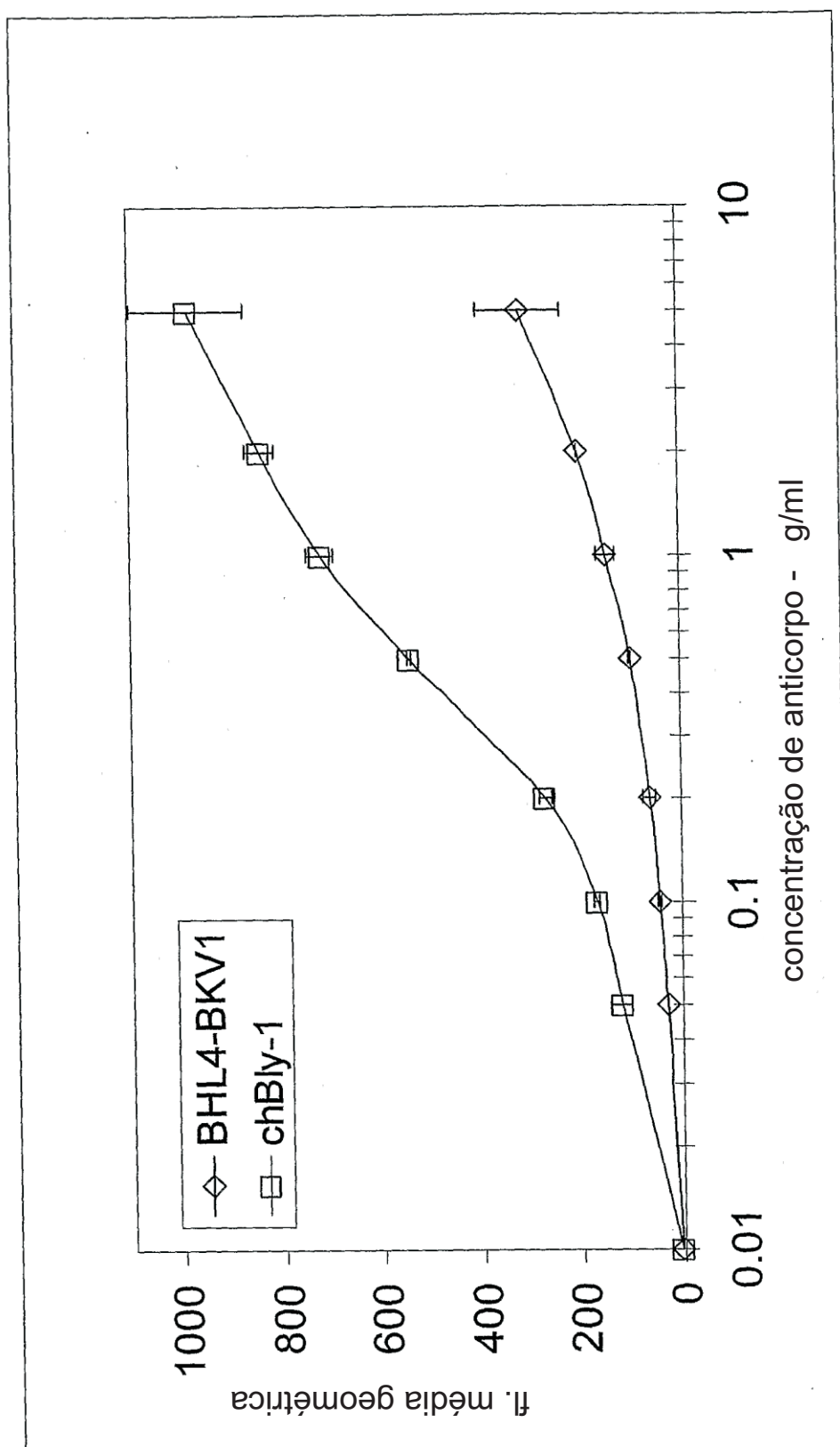


FIG.11

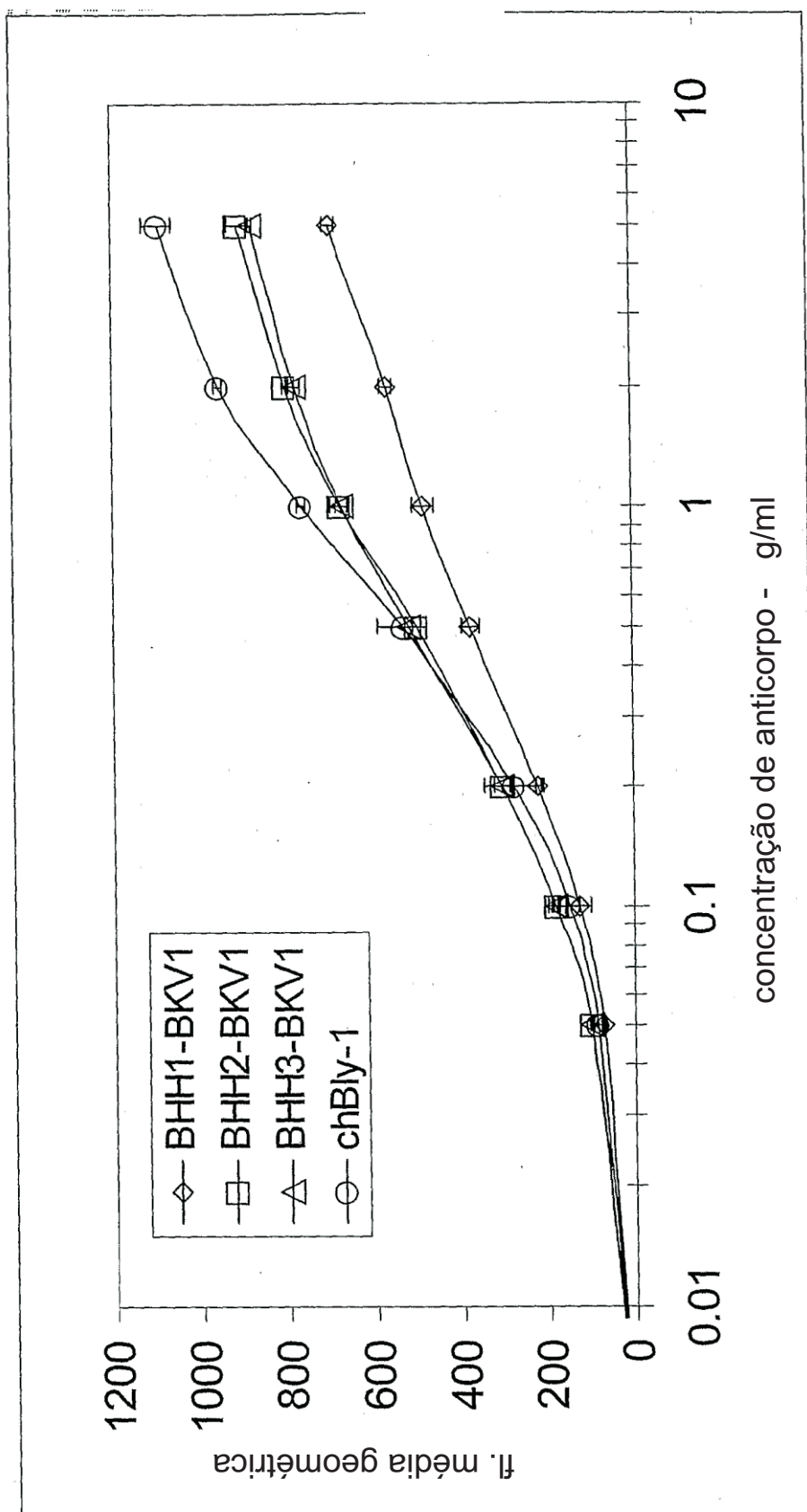


FIG.12

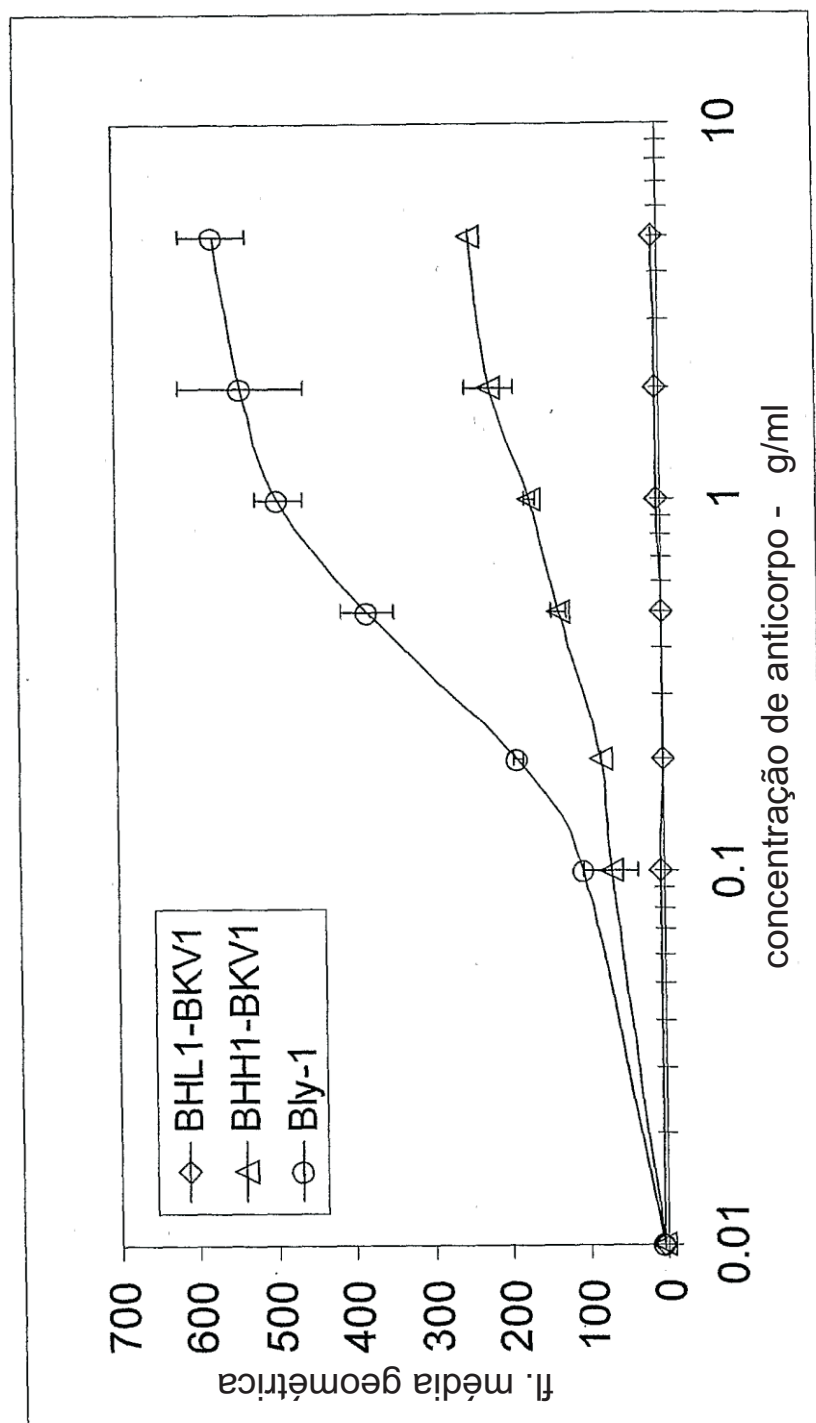




FIG.13

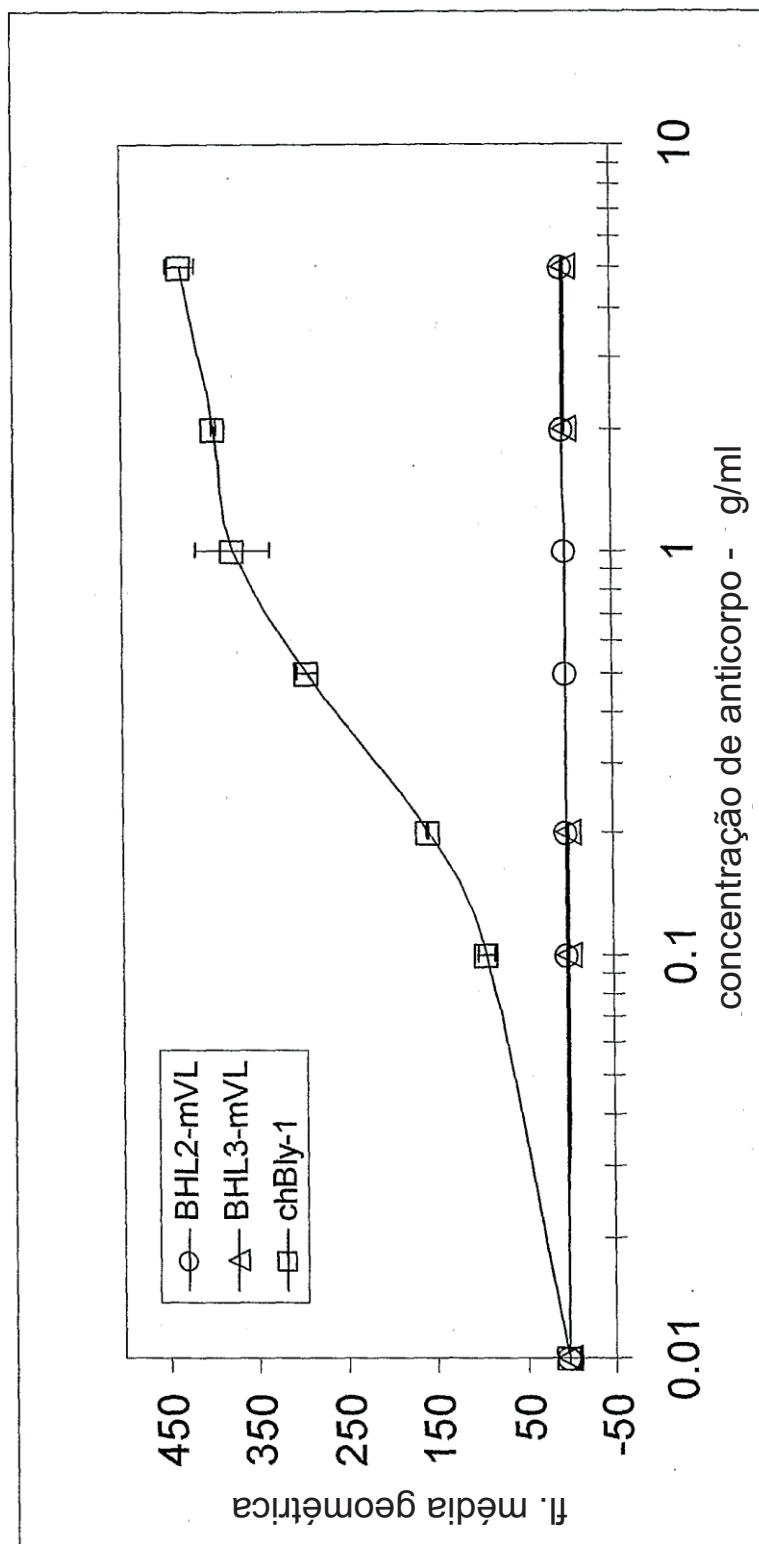


FIG.14

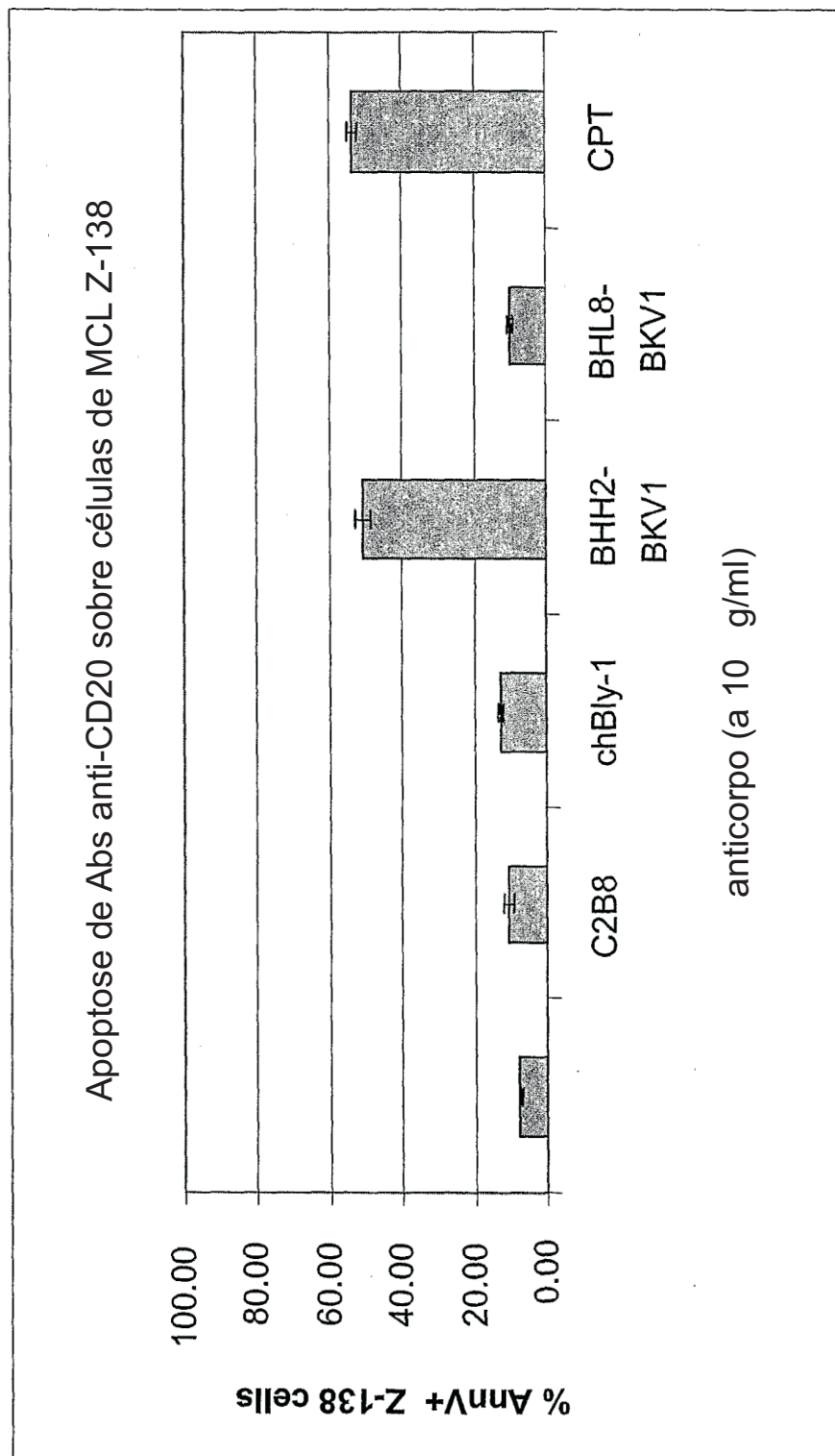


FIG.15

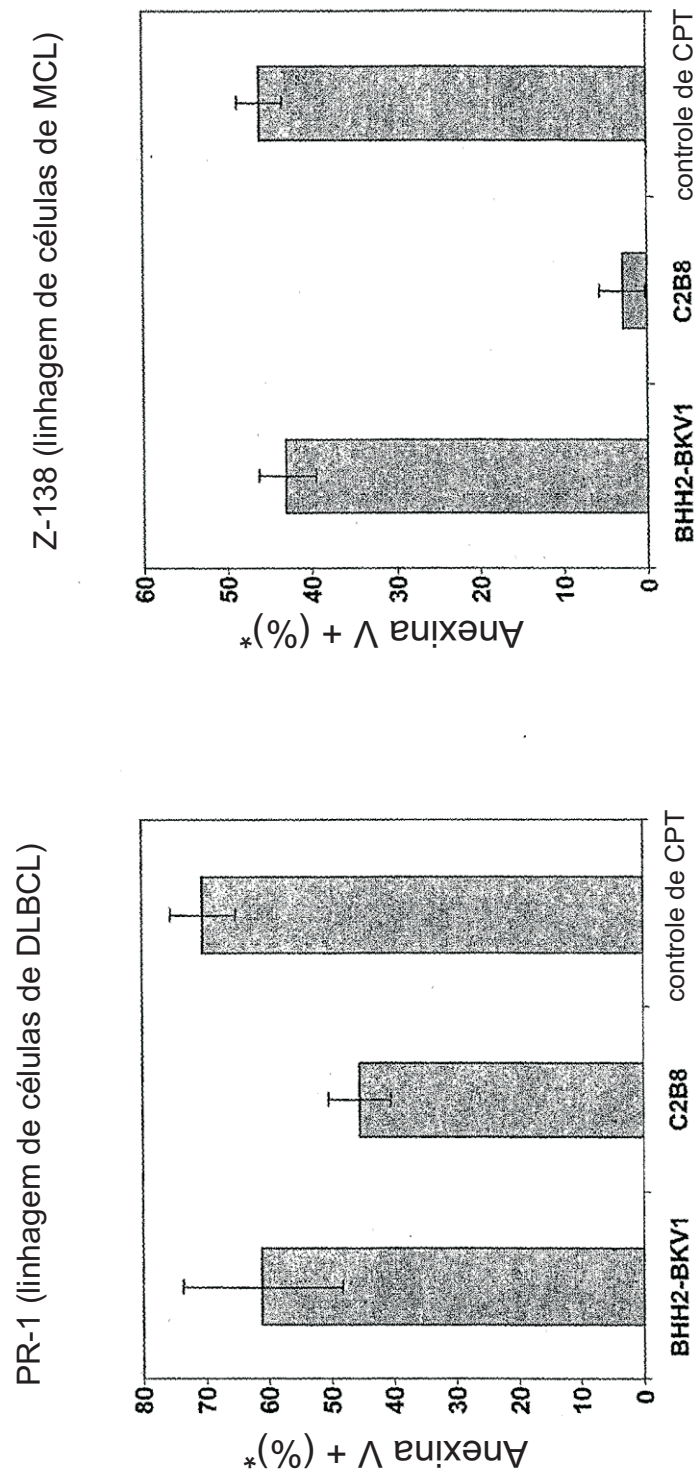


FIG.16

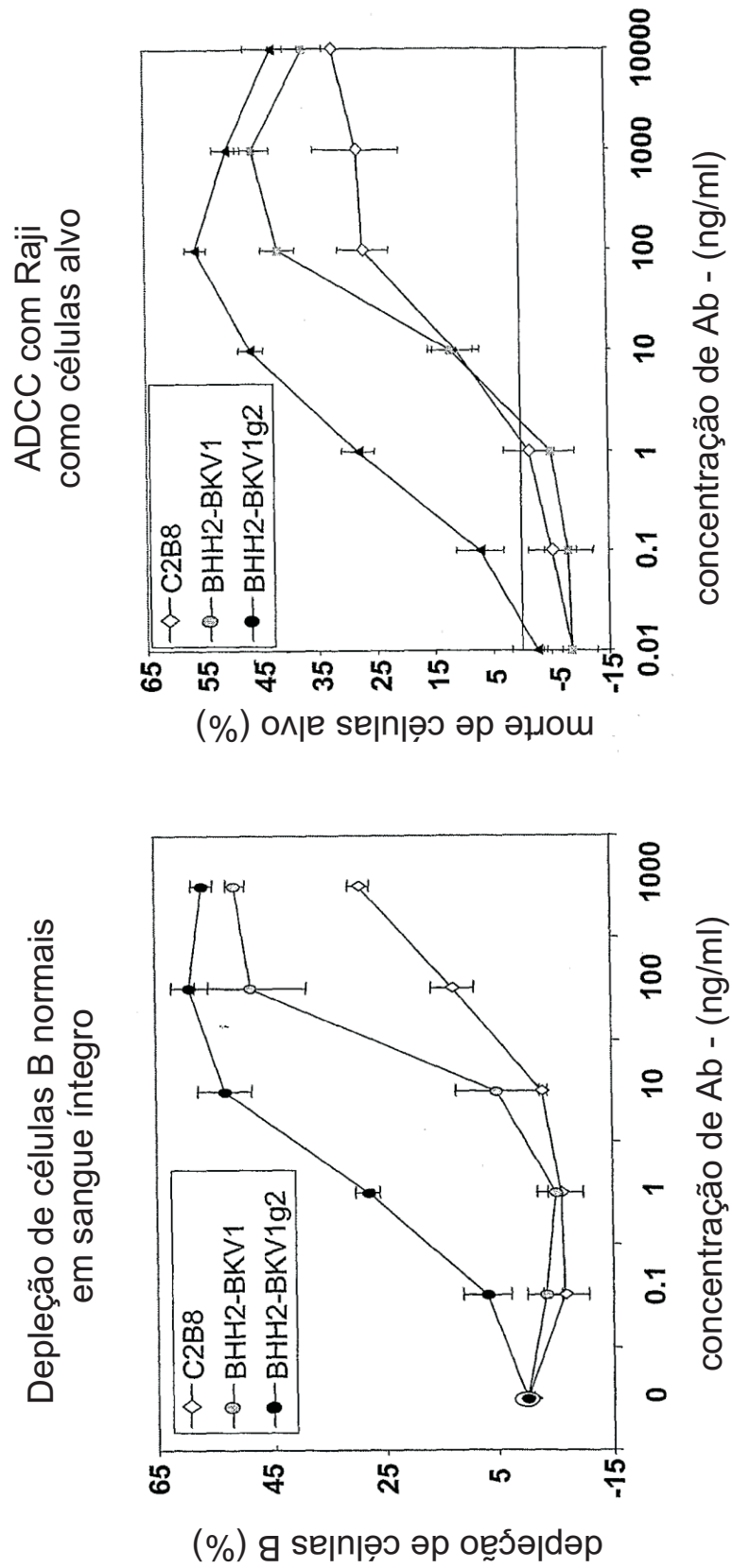


FIG.17

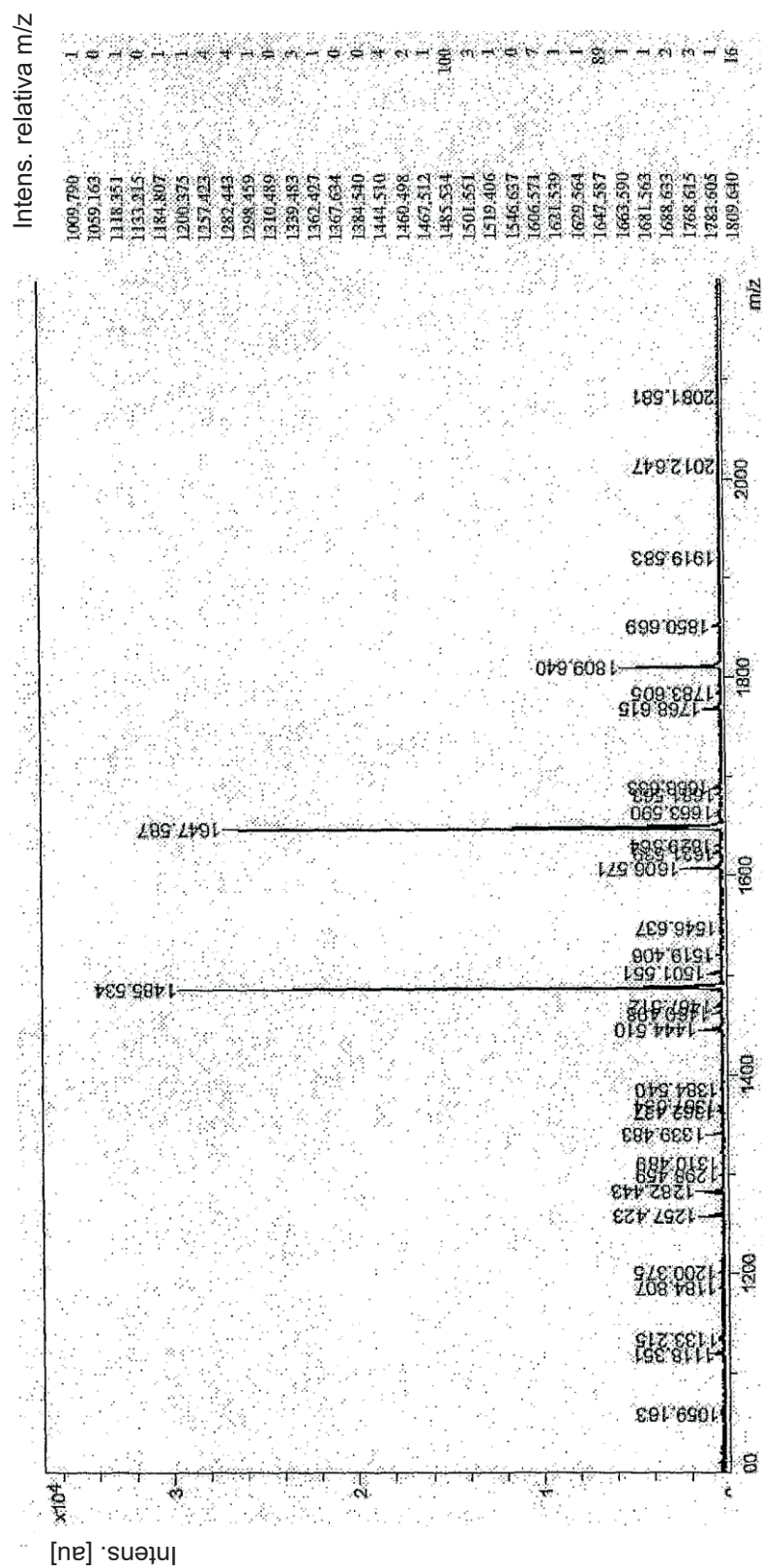


Figure 18

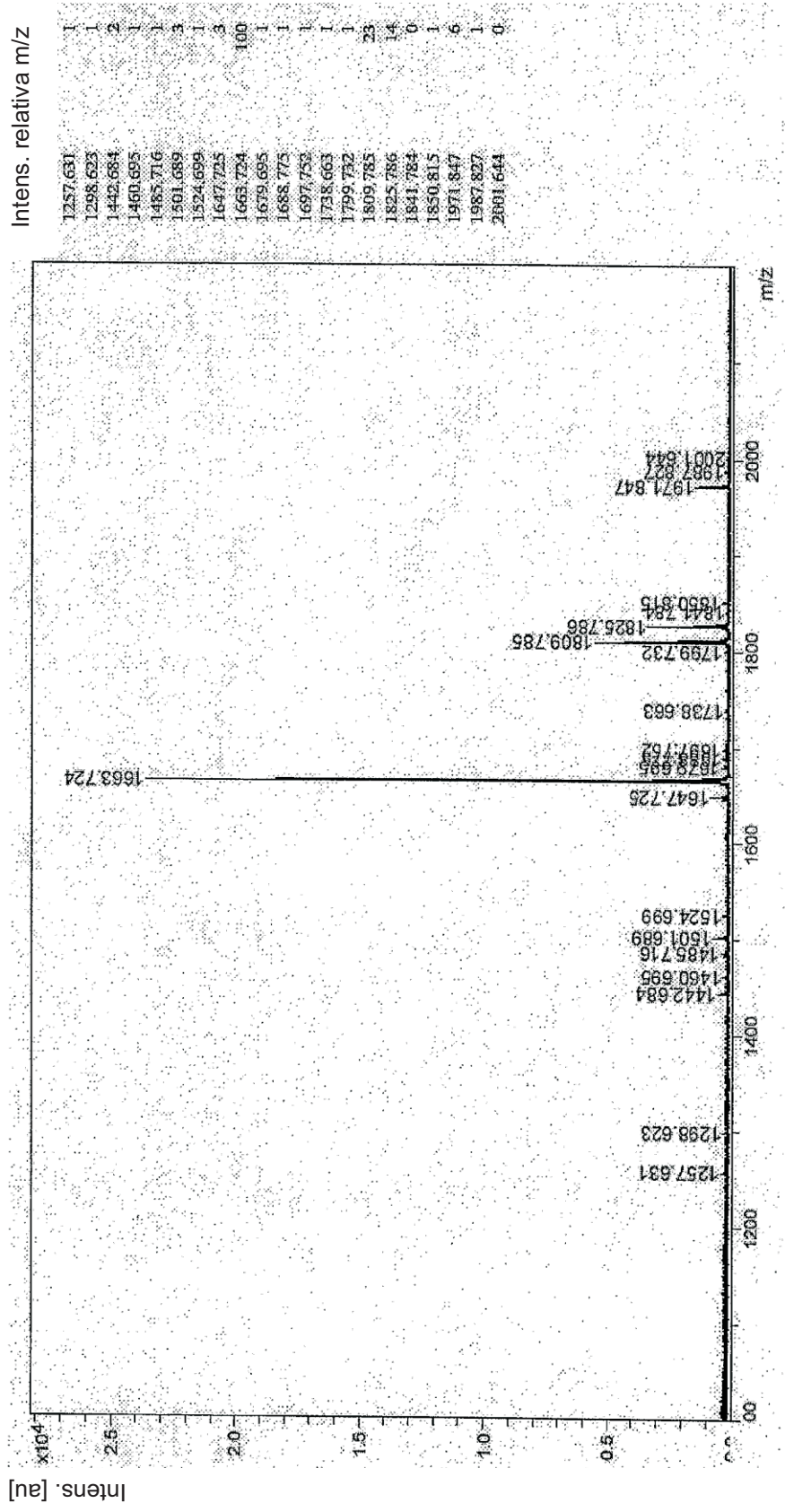




Figure 19

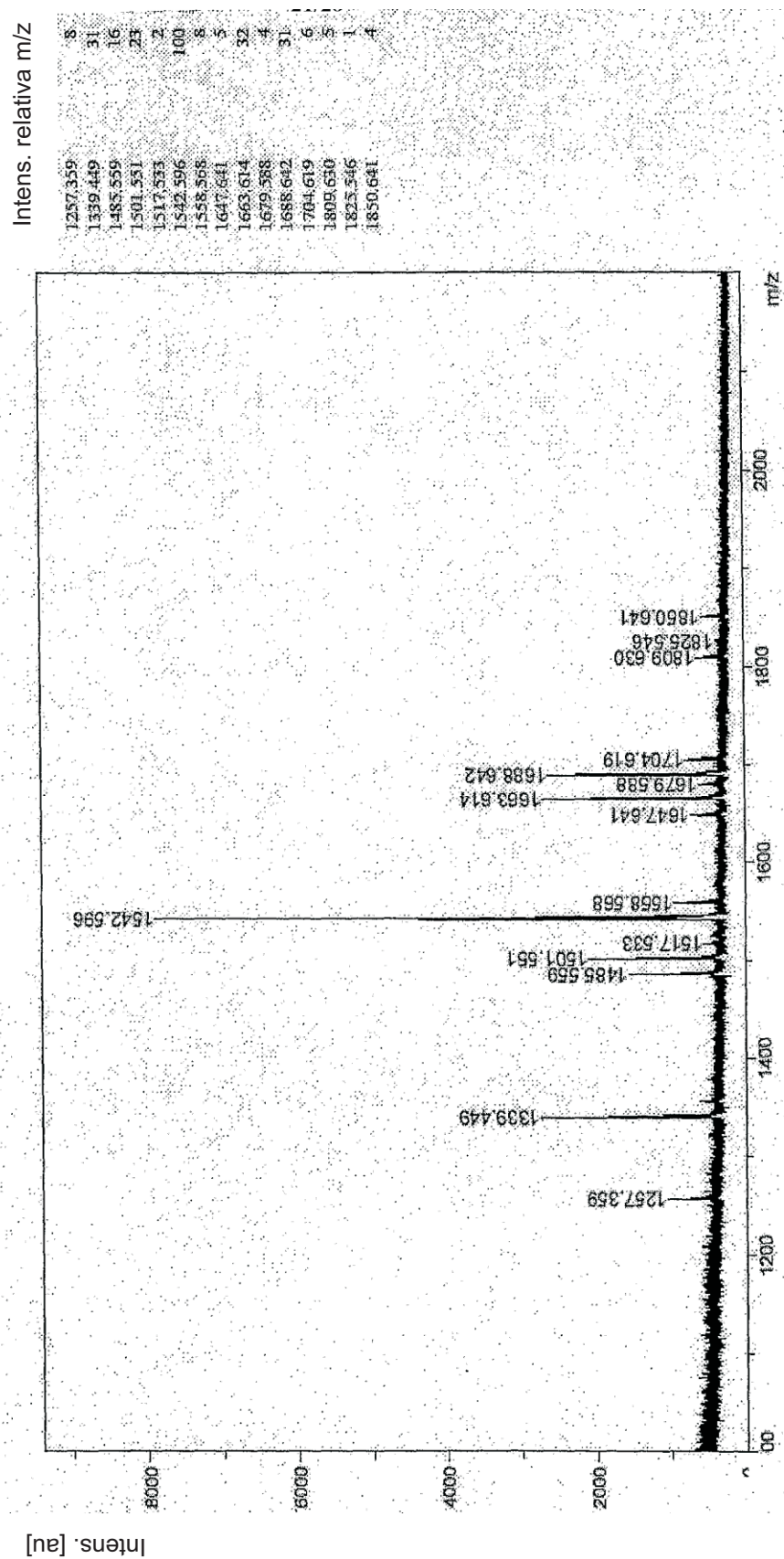
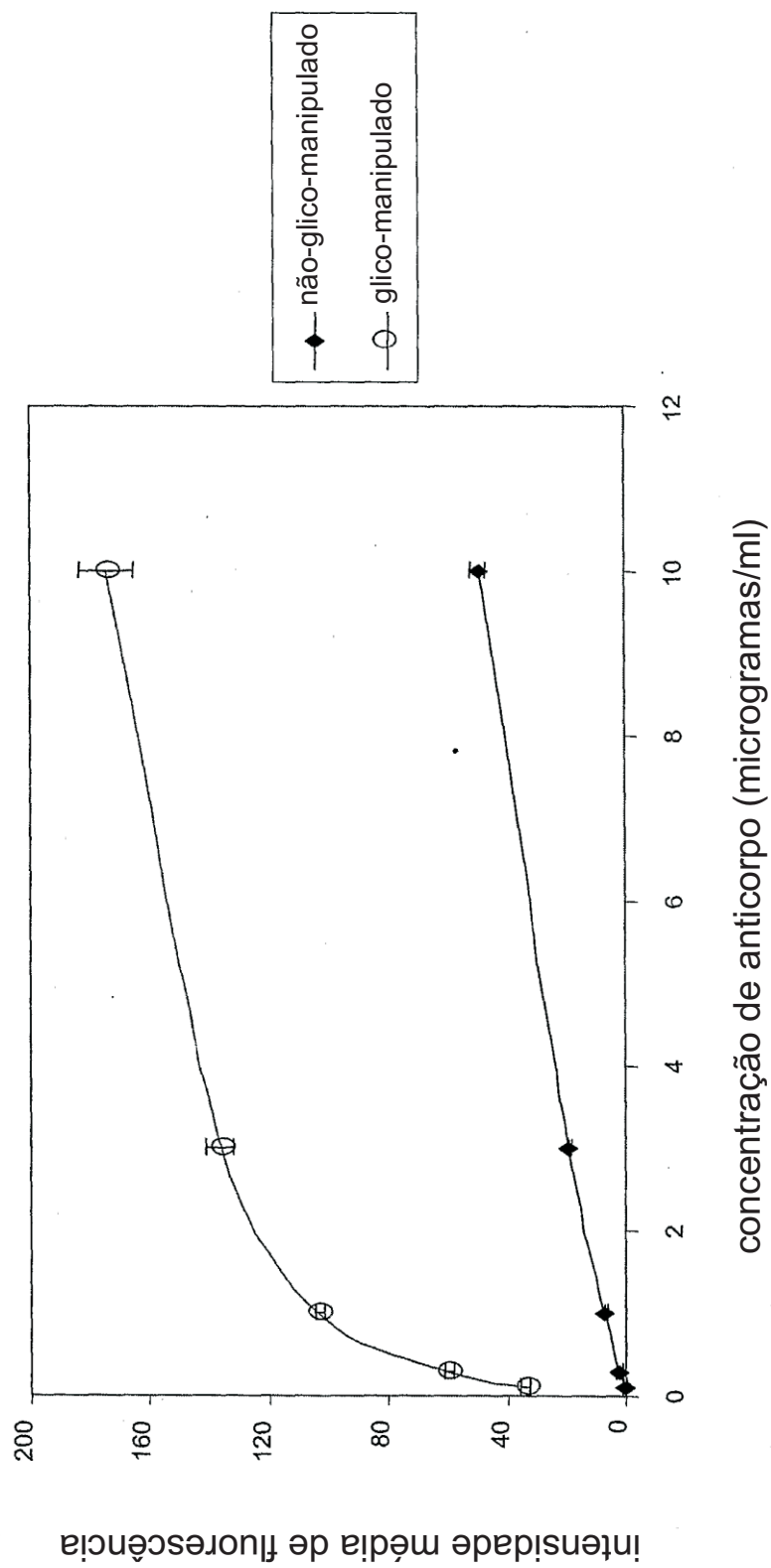


FIG.20

ligação de Ab ao FcγamaRIII sobre a superfície de células CHO-CD16





**FIG.21**  
apoptose por Abs anti-CD20  
linhagem de células de linfoma de manto Z-138

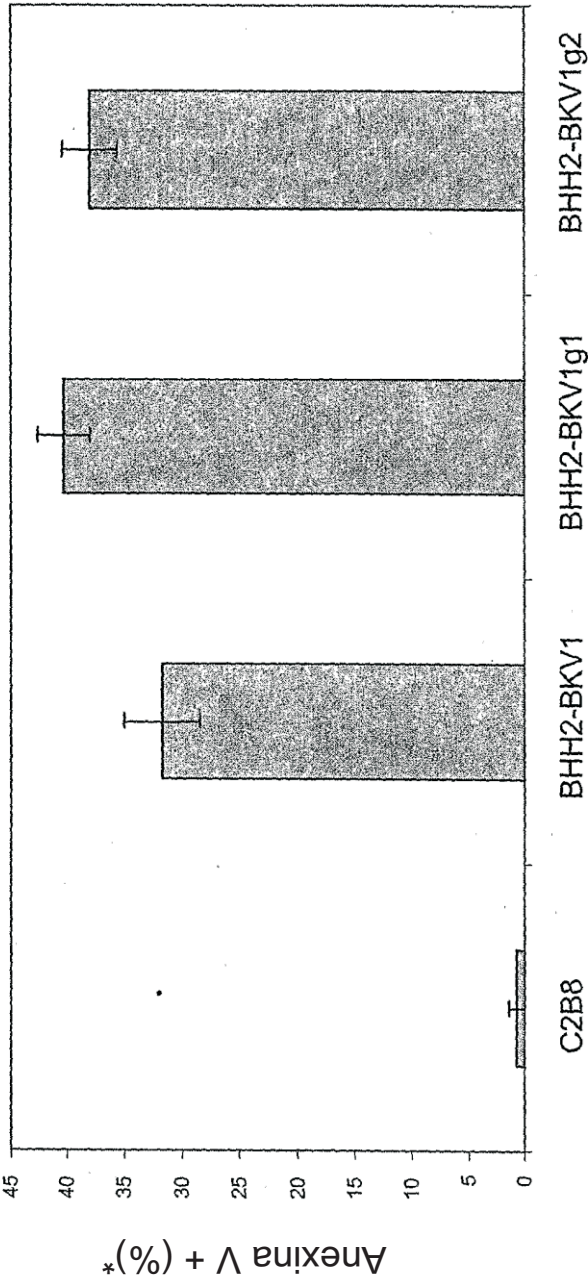


FIG.22

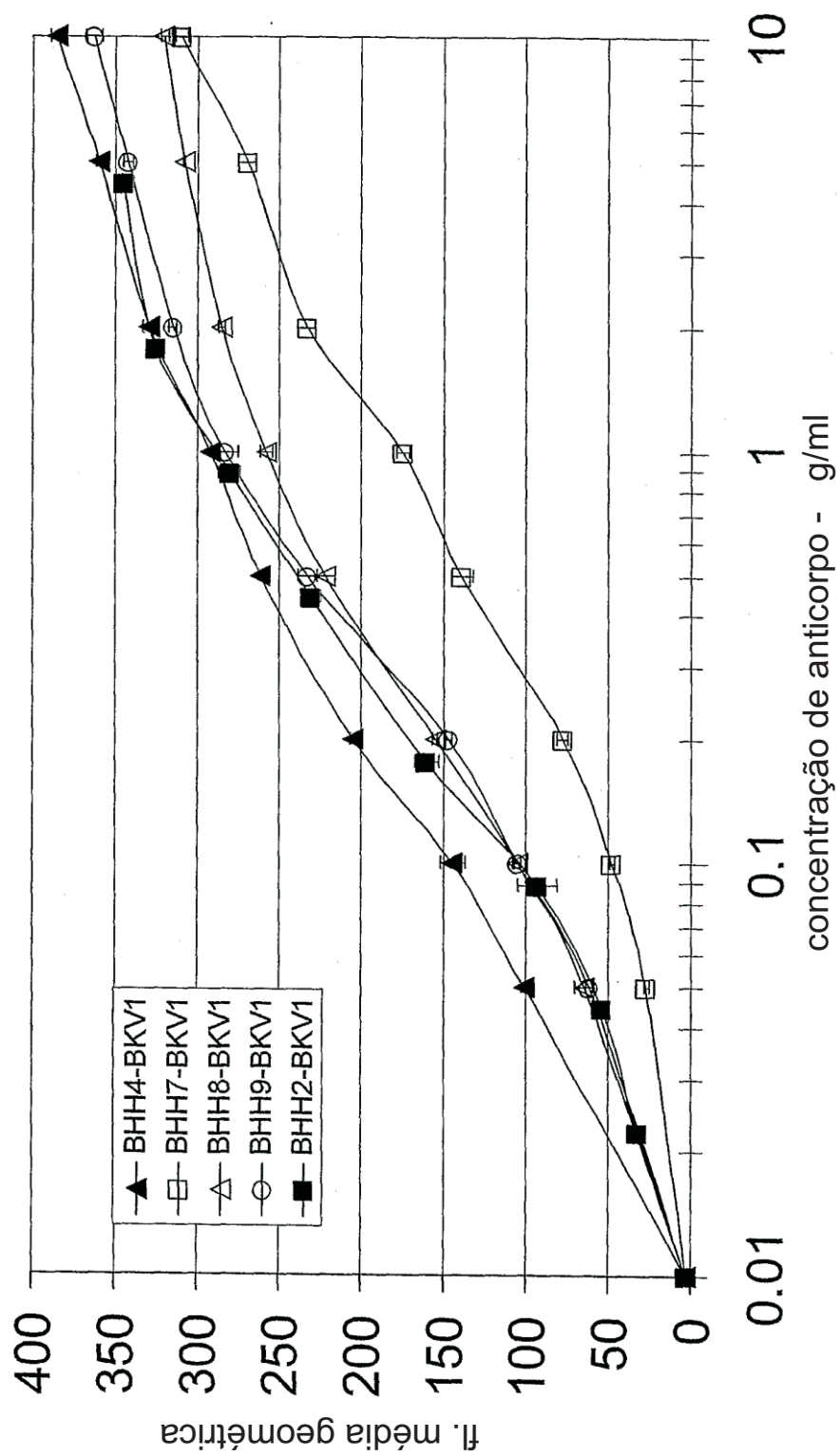


FIG.23

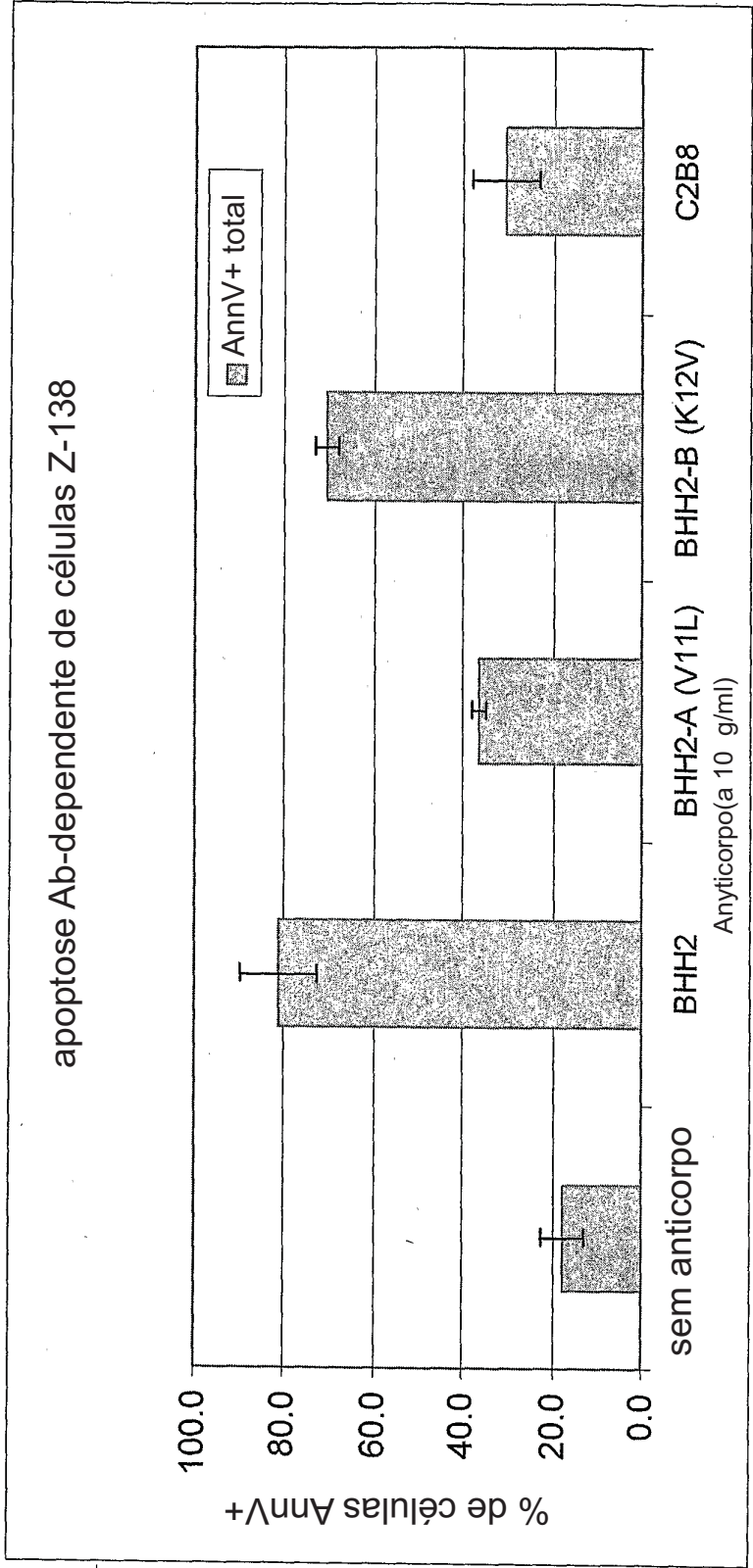


FIG.24

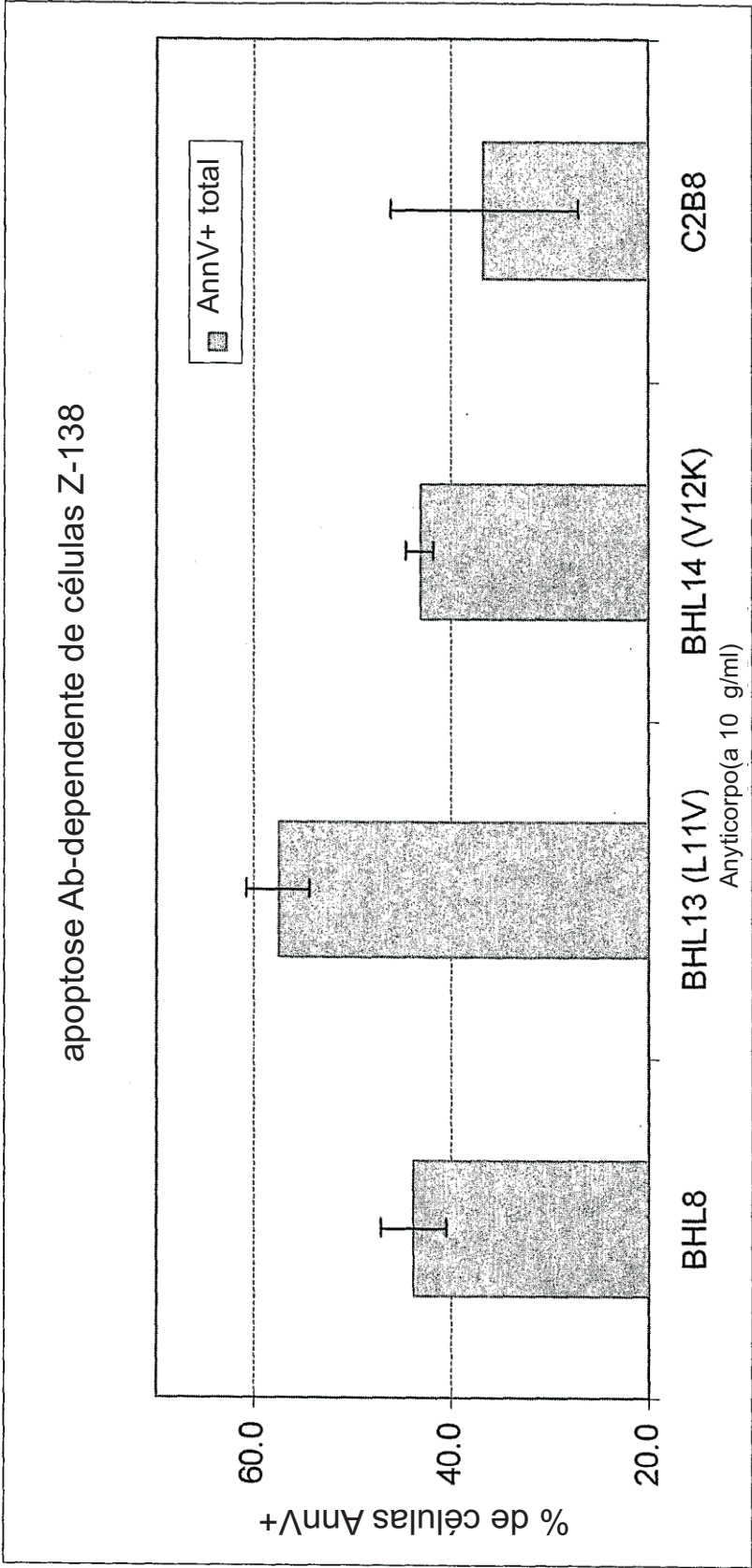


FIG.25

apoptose Ab-dependente de células Z-138

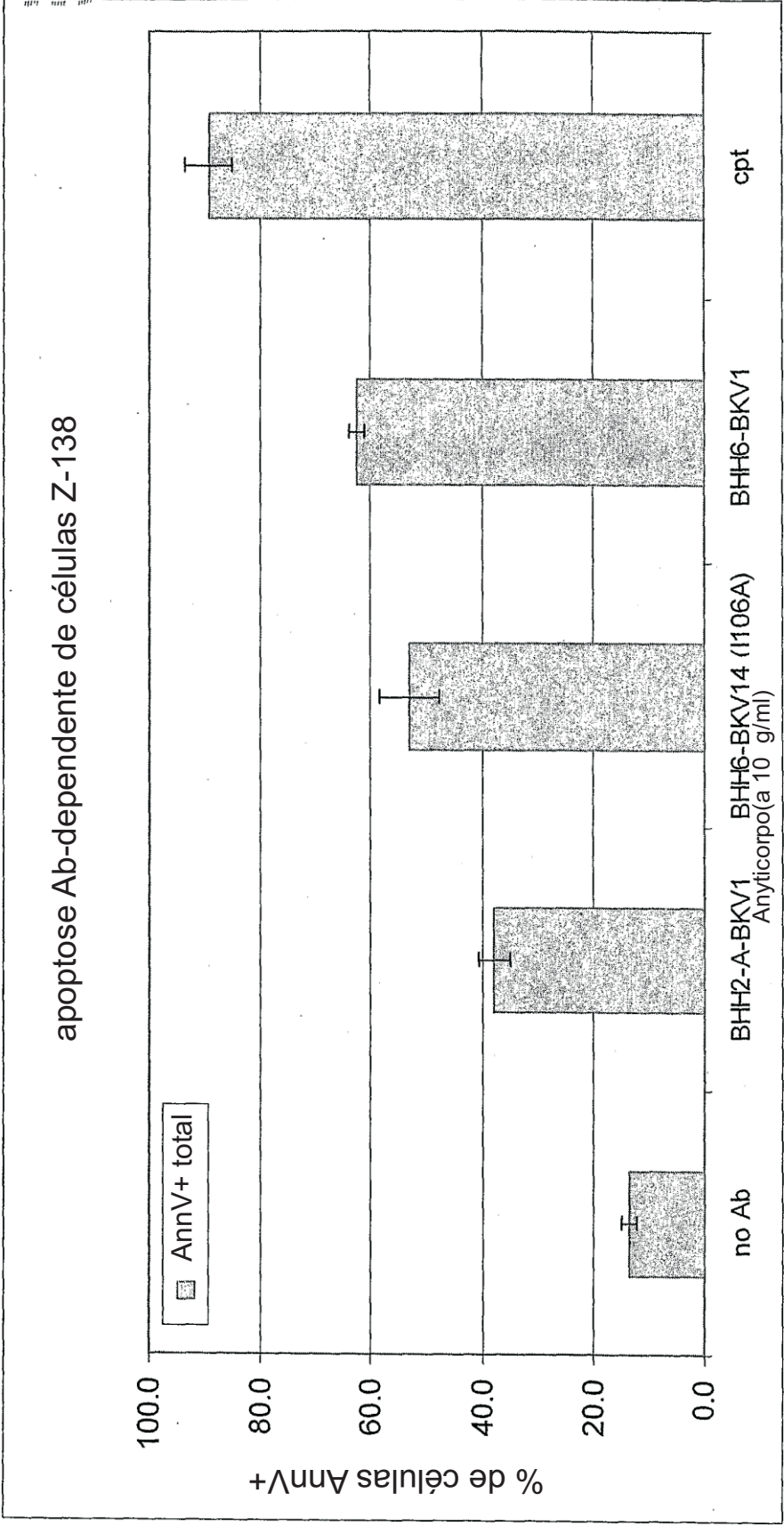






FIG.26