



INPI
Assinado
Digitalmente

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

CARTA PATENTE Nº PI 0315295-2

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

(21) Número do Depósito: PI 0315295-2

(22) Data do Depósito: 17/10/2003

(43) Data da Publicação do Pedido: 29/04/2004

(51) Classificação Internacional: C07K 16/28; C07K 16/30; C12N 5/22; C12N 5/24; C12N 15/63.

(30) Prioridade Unionista: US 60/460,028 de 02/04/2003; US 60/419,163 de 17/10/2002.

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, USOS DE UM ANTICORPO, MÉTODOS IN VITRO DE DETECTAR A PRESENÇA DE ANTÍGENO DE CD20 OU UMA CÉLULA QUE EXPRESSA CD20 EM UMA AMOSTRA, KIT, E, VETOR DE EXPRESSÃO

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

(72) Inventor: JESSICA TEELING; SIGRID RUULS; MARTIN GLENNIE; JAN G. J. VAN DE WINKEL; PAUL PARREN; JORGE PETERSEN; OLE D. M. SC. BAADSGAARD; HAICHUN HUANG.

Código de Controle: 4280ED5B05B34298 5453160070BDB44C

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 26/12/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 26/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, USOS DE UM ANTICORPO, MÉTODOS IN VITRO DE DETECTAR A PRESENÇA DE ANTÍGENO DE CD20 OU UMA
5 CÉLULA QUE EXPRESSA CD20 EM UMA AMOSTRA, KIT, E, VETOR DE EXPRESSÃO”

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade para o Pedido Provisório U.S. Nº: 60/419163, depositado em 17 de outubro de 2002, e Pedido Provisório U.S.
10 Nº: 60/460028, depositado em 2 de abril de 2003, ambos intitulados “ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS CONTRA CD20”, e ambos os quais são aqui incorporados em sua totalidade por esta referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A molécula CD20 (também chamada de antígeno de
15 diferenciação restrita a linfócito B humano ou Bp35) é uma proteína de transmembrana hidrofóbica com um peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada em linfócitos pré B e B maduro (Valentine *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264(19): 11282 a 11287; e Einfield *et al.* (1988) EMBO J. 7(3): 711 a 717). A CD20 é encontrado na superfície de mais do que 90 % de células B a
20 partir do sangue periférico ou órgãos linfóides e é expressada durante o desenvolvimento de célula pré B precoce e permanece até a diferenciação de célula no plasma. A CD20 está presente tanto nas células B normais assim como nas células B malignas. Em particular, a CD20 é expressada em mais do

que 90 % dos linfomas não de Hodgkin de célula B (NHL) (Anderson *et al.* (1984) Blood 63(6): 1424 a 1433), mas não é encontrado nas células tronco hematopoiéticas, pró células B, células de plasma normais ou outros tecidos normais (Tedder *et al.* (1985) J. Immunol. 135(2): 973 a 979).

5 Os 85 aminoácido da região de terminal carboxila da proteína CD20 estão localizados dentro do citoplasma. O comprimento desta região contrasta com aquela de outras Estruturas de superfície específica célula B tais como as cadeias pesadas IgM, IgD, e IgG ou antígenos de histocompatibilidade de cadeias α ou β de classe II, que têm regiões intracitoplasmáticas relativamente curta de 3, 3, 28, 15 e 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy *et al.* (1983) NAR 11: 6775 a 6785). Dos últimos 61 aminoácidos do terminal carboxila, 21 são resíduos ácidos, ao passo que apenas 2 são básicos, indicando que esta região tem uma carga negativa líquida forte. O N^o de Acesso no GenBank é NP_690605.

15 É considerado que a CD20 estaria envolvida na regulação de uma etapa ou etapas iniciais no processo de ativação e diferenciação de células B (Tedder *et al.* (1986) Eur. J. Immunol. 16: 881 a 887) e pode funcionar como um canal de íon cálcio (Tedder *et al.* (1990) J. Cell. Biochem. 14D: 195).

20 A despeito da incerteza a cerca da função real da CD20 na promoção da proliferação e/ou diferenciação de células B, ela fornece um alvo importante para a terapia mediada pelo anticorpo para controlar ou matar as células B envolvidas em cânceres e distúrbios autoimunes. Em particular, a expressão de CD20 em células de tumor, por exemplo, NHL, a torna um alvo importante para a terapia mediada pelo anticorpo para alvejar especificamente agentes terapêuticos contra células neoplásticas positivas em CD-20. 25 Entretanto, embora os resultados obtidos até agora claramente estabeleçam a CD20 como um alvo útil para a imunoterapia, eles também mostram que anticorpos de murino e quiméricos correntemente disponíveis não constituem

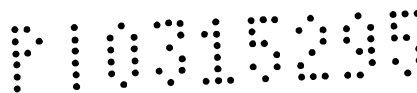
agentes terapêuticos ideais.

Conseqüentemente, a necessidade existe quanto a anticorpos terapêuticos melhorados contra CD20 que são eficazes na prevenção e/ou tratamento de uma faixa de doenças que envolvam células que expressam CD20.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece produtos terapêuticos de anticorpo melhorados para o tratamento e/ou prevenção de doenças associadas com células que expressam CD20, incluindo doenças relacionadas com tumor e doenças imunes, incluindo doenças autoimunes. Os anticorpos abrangidos pela invenção são melhorados em que eles são totalmente humanos e, assim, são potencialmente menos imunogênicos nos pacientes.

Como aqui exemplificado, os anticorpos humanos da invenção medeiam a morte de células B que expressam CD20 por uma variedade de mecanismos. Em uma forma de realização, os anticorpos humanos da invenção induzem a citotoxicidade dependente de complemento (CDC), por exemplo, pelo menos cerca de 20 % das CDCs mediarão a lise, preferivelmente cerca de 30 % das CDCs mediarão a lise e mais preferivelmente de 40 a 50 % mediarão a lise em células, tais como as células da leucemia linfocítica B crônica (B-CLL). Em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos da invenção induzem a apoptose de células que expressam a CD20. Em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos da invenção induzem a adesão homotípica de células que expressam CD20. Além disso, os anticorpos humanos da invenção podem induzir anticorpo dependentes da citotoxicidade celular (ADCC) de células que expressam CD20 na presença de células efectoras humanas (por exemplo, monócitos, células mononucleares, células NK e PMNs). Além disso, os anticorpos humanos da invenção podem induzir a fagocitose de células que expressam CD20 na presença de macrófagos. Os anticorpos monoclonais



humanos da invenção podem funcionar por um ou mais destes mecanismos. Os exemplos de células que podem ser mortos pelos anticorpos humanos da presente invenção incluem, mas não são limitados às células B que expressam CD20, tais como células B tumorigênicas e células B envolvidas em doenças imunes. Em uma forma de realização particular, os anticorpos humanos são usados para mediar a morte de linfócitos B no tratamento de linfoma, por exemplo, linfoma não de Hodgkin de célula B.

Os anticorpos humanos da invenção incluem anticorpos IgG1 (por exemplo, IgG1 κ), IgG3 (por exemplo, IgG3 κ) e IgG4 (por exemplo, IgG4 κ). Entretanto, outros isótipos de anticorpo também são abrangidos pela invenção, incluindo IgG2, IgM, IgA1, IgA2, IgA, IgD e IgE secretores. Os anticorpos podem ser anticorpos inteiros ou fragmentos de ligação de antígeno destes incluindo, por exemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, fragmentos Fv de cadeia única ou anticorpos biespecíficos. Além disso, os fragmentos de ligação de antígeno incluem as proteínas de fusão do domínio de ligação de imunoglobulina que compreende (i) um domínio de ligação do polipeptídeo (tais como uma região variável de cadeia pesada ou uma região variável de cadeia leve) que é fundida a um polipeptídeo da região de articulação de imunoglobulina, (ii) uma região constante CH₂ de cadeia pesada da imunoglobulina fundida à região de articulação e (iii) uma região constante CH₃ de cadeia pesada da imunoglobulina fundida à região constante CH₂. Tais proteínas de fusão do domínio de ligação de imunoglobulina são ainda divulgados na US 2003/0118592 e US 2003/0133939.

Os anticorpos humanos particulares da presente invenção incluem aqueles aludidos como 11B8, 2F2 e 7D8, codificados pelos ácidos nucléicos da cadeia pesada humana e cadeia leve capa humana que compreendem as seqüências de nucleotídeo nas suas regiões variáveis como apresentado nas SEQ ID NOs: 1, 5 ou 9 e SEQ ID NOs: 3, 7 ou 11, respectivamente e suas modificações de seqüência conservativas. Em uma



outra forma de realização, os anticorpos humanos são caracterizados por ter regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia leve humana que compreendem as seqüências de aminoácido como apresentadas nas SEQ ID NOs: 2, 6 ou 10 e SEQ ID NOs: 4, 8 ou 12, respectivamente e suas modificações de seqüência conservativas.

Já em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos são caracterizado por ter regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia leve humana que são pelo menos 90 % homólogas, preferivelmente pelo menos 95 % homólogas e mais preferivelmente pelo menos 98 % ou pelo menos 99 % homólogas às seqüências de aminoácido como apresentadas na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente; SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8, respectivamente; ou SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12, respectivamente.

Outros anticorpos humanos particulares da invenção incluem aqueles que compreendem um domínio de CDR tendo uma região CDR1 de cadeias pesada e leve humanas, uma região CDR2 de cadeias pesada e leve humanas e uma região CDR3 de cadeias pesada e leve humanas, em que

(a) as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada humana compreendem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste das seqüências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas nas figuras 53, 55 ou 57 (SEQ ID NOs: 13 a 15, 19 a 21 e 25 a 27) e suas modificações de seqüência conservativas, e

(b) as Regiões de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve humana compreendem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste das seqüências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 mostradas nas figuras 53, 55 ou 57 (SEQ ID NOs: 16 a 18, 22 a 24 e 28 a 30) e suas modificações de seqüência conservativas.

Também incluídas dentro da presente invenção estão os anticorpos que se dissociam de CD20 com uma constante de equilíbrio de



dissociação (K_D) de aproximadamente 1 a 10 nM ou menos. Tais anticorpos também incluem aqueles que não reagem cruzado com antígenos de superfície celular relacionados e assim não inibem a sua função.

Em uma outra forma de realização, os anticorpos anti-CD20 humanos da presente invenção podem ser caracterizados por uma ou mais das seguintes propriedades:

- a) especificidade para a CD20 humana;
- b) uma afinidade de ligação para CD20 (K_D) de cerca de 10 nM ou menos, preferivelmente, cerca de 5 nM ou menos e, mais preferivelmente, cerca de 1 a 3 nM ou menos como determinado pelo experimento de ligação divulgado no Exemplo 5 (Figura 9) aqui;
- c) uma constante de taxa de dissociação (k_d) de CD20 de cerca de 10^{-4} s $^{-1}$ ou menos, preferivelmente, de cerca de 10^{-5} s $^{-1}$ ou menos e, mais preferivelmente, de cerca de 10^{-6} s $^{-1}$ ou menos, como determinado pelo experimento de taxa de dissociação divulgado no Exemplo 5 (Figura 9) aqui;
- d) a capacidade para mediar um nível alto de CDC em células CD55/59 negativas ou CD55/59 positivas;
- e) a capacidade para translocar em balsas lipídicas na ligação à CD20;
- f) a capacidade para inibir o crescimento de células que expressam CD20;
- g) a capacidade para induzir a apoptose de células que expressam CD20;
- h) a capacidade para induzir a adesão homotípica de células que expressam CD20;
- i) a capacidade para induzir ADCC de células que expressam CD20 na presença de células efectoras;
- j) a capacidade para prolongar a sobrevivência de um paciente tendo células de tumor que expressam CD20;

k) a capacidade para esgotar as células que expressam CD20;

e/ou

l) a capacidade para esgotar as células que expressam níveis baixos de CD20 (células CD20^{baixo}).

5 Os anticorpos anti-CD20 humanos da presente invenção podem ser derivatizados, ligados ou co-expressados com outras especificidades de ligação. Em uma forma de realização particular, a invenção fornece uma molécula biespecífica ou multiespecífica que compreende pelo menos uma primeira especificidade de ligação para CD20 (por exemplo, um

10 anticorpo anti-CD20 humano ou mimético deste) e uma segunda especificidade de ligação para uma célula efetora humana, tal como uma especificidade de ligação para um receptor Fc (por exemplo, um receptor Fc γ RI humano, tal como Fc γ RI ou um receptor Fc α humano) ou um receptor de célula T, por exemplo, CD3.

15 Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas e multiespecíficas que se ligam tanto à CD20 humana quanto a um receptor Fc ou um receptor de célula T, por exemplo, CD3. Os exemplos de receptores Fc são, por exemplo, um receptor da IgG humana, por exemplo, um receptor Fc-gama (Fc γ R), tal como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ

20 RIII (CD16). Outros receptores Fc, tais como receptores de IgA humana (por exemplo, Fc α RI), também podem ser alvejados. O receptor Fc está preferivelmente localizado na superfície de uma célula efetora, por exemplo, um monócito, macrófago ou uma célula mononuclear ativada. Em uma forma de realização preferida, as moléculas biespecíficas e multiespecíficas se ligam

25 a um receptor Fc em um sítio que é distinto do sítio de ligação de imunoglobulina Fc (por exemplo, IgG ou IgA) do receptor. Portanto, a ligação das moléculas biespecíficas e multiespecíficas não é bloqueada pelos níveis fisiológicos de imunoglobulinas.

Já em um outro aspecto, os anticorpos anti-CD20 humanos da



invenção são derivatizados, ligados a ou co-expressados com uma outra molécula funcional, por exemplo, um outro peptídeo ou proteína (por exemplo, um fragmento Fab'). Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, pela ligação química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tais como um outro anticorpo (por exemplo, para produzir um anticorpo biespecífico ou um multiespecífico), uma citotoxina, ligando celular ou antígeno (por exemplo, para produzir um imunoconjugado, tal como uma imunotoxina). Um anticorpo da presente invenção pode ser ligado a outras porções terapêuticas, por exemplo, um radioisótopo, um medicamento anticâncer de molécula pequena, um agente anti-inflamatório ou um agente imunossupressivo. Conseqüentemente, a presente invenção abrange uma variedade grande de anticorpos conjugados, moléculas biespecíficas e multiespecíficas e proteínas de fusão, todos os quais se ligam às células que expressam CD20 e que podem ser usados para alvejar outras moléculas a tais células.

Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece composições, por exemplo, composições/kits farmacêuticos e de diagnóstico, que compreendem um carregador farmacêuticamente aceitável formulado junto com um ou uma combinação de anticorpos monoclonais humanos da invenção. Em uma forma de realização particular, a composição inclui uma combinação de anticorpos que se ligam a epítomos distintos ou que possuam características funcionais distintas, tais como induzir CDC e induzir apoptose.

Os anticorpos humanos, imunoconjugados, moléculas biespecíficas e multiespecíficas e composições da presente invenção podem ser usados em uma variedade de métodos para inibir o crescimento de células que expressam CD20 e/ou células matadoras que expressam CD20 contatando-se as células com uma quantidade eficaz do anticorpo, imunoconjugado, molécula ou composição biespecíficas/ multiespecíficas, tal

que o crescimento da célula seja inibido e/ou a célula seja morta. Em uma forma de realização, o método inclui a morte da célula que expressa CD20 na presença de células efectoras, por exemplo, pela CDC, apoptose, ADCC, fagocitose ou por uma combinação de dois ou mais destes mecanismos. As células são preferivelmente mortas ou inibidas sem matar ou inibir a atividade de células que não expressam CD20 mas que, por exemplo, podem expressar um antígeno de superfície celular estruturalmente relacionado (isto é, sem reatividade cruzada com os antígenos de superfície celular relacionados porém funcionalmente distintos). As células que expressam CD20 que podem ser inibidas ou mortas usando os anticorpos humanos da invenção incluem, por exemplo, células B tumorigênicas.

Conseqüentemente, os anticorpos humanos da presente invenção podem ser usados para tratar e/ou prevenir uma variedade de doenças que envolvem células que expressam CD20 pela administração dos anticorpos aos pacientes que sofrem de tais doenças. As doenças exemplares que podem ser tratadas (por exemplo, melhoradas) ou prevenidas incluem, mas não são limitadas às, doenças tumorigênicas e doenças imunes, por exemplo, doenças autoimunes. Os exemplos de doenças tumorigênicas que podem ser tratadas e/ou prevenidas incluem linfoma de célula B, por exemplo, NHL, incluindo leucemia/linfoma linfoblásticos de célula B precursores e neoplasmas de célula B maduros, tais como leucemia linfocítica crônica de célula B (CLL)/linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia prolinfocítica de célula B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de célula de manto (MCL), linfoma folicular (FL), incluindo FL grau baixo, grau intermediário e grau alto, linfoma do centro de folículo cutâneo, linfoma de célula B de zona marginal (tipo MALT, nodal e tipo esplênico), leucemia de célula pilosa, linfoma de célula B grande difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de célula plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós transplante, macroglobulinemia de Waldenström e linfoma de célula grande

anaplástico (ALCL). Os exemplos de distúrbios imune em que as células que expressam CD20 B estão envolvidas que podem ser tratados e/ou prevenidos incluem psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma sistêmico e esclerose, doença do intestino inflamatório (IBD), doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência na adesão de leucócito, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behçet, nefrite do complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imuno-

10 mediadas, tais como a púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefrite de lupo, lupo eritematoso sistêmico, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, granulomatose de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose

15 infecciosa aguda, HIV e doenças associadas ao vírus do herpes. Outros exemplos são síndrome da angústia respiratória aguda grave e coreorretinite. já outros exemplos são doenças e distúrbios causados pela infecção de células B com vírus, tais como o vírus de Epstein-Barr (EBV).

Em uma forma de realização particular da invenção, o paciente

20 que é administrado com o anticorpo é adicionalmente tratado com um agente quimioterapêutico, radiação ou um agente que module, por exemplo, realce ou iniba, a expressão ou atividade de um receptor Fc, por exemplo, um receptor $Fc\alpha$ ou um receptor $Fc\gamma$, tal como uma citocina. As citocinas típicas para a administração durante o tratamento incluem fator estimulador de

25 colônia de granulócito (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose de tumor (TNF). os agentes terapêuticos típicos incluem, entre outros, agentes anti-neoplástico tais como doxorubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, clorambucila e ciclofosfamida.

Já em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para detectar *in vitro* ou *in vivo* a presença de CD20 em uma amostra ou indivíduo, por exemplo, para diagnosticar uma doença relacionada com CD20, preferivelmente em um estágio inicial. Isto também pode ser útil para monitorar a doença e o efeito do tratamento e para determinar e ajustar a dose do anticorpo a ser administrado. O método *in vivo* pode ser realizado usando a técnica de produção de imagem tal como PET (tomografia de emissão de positron) ou SPECT (tomografia computadorizada de emissão de fóton único). Em uma forma de realização, isto é obtido contatando-se uma amostra a ser testada, opcionalmente junto com uma amostra de controle, com um anticorpo monoclonal humano da invenção sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e CD20. A formação de complexo é depois detectada (por exemplo, usando uma análise FACS ou Western blotting). quando do uso de uma amostra de controle junto com a amostra de teste, o complexo é detectado em ambas as amostras e qualquer diferença estatisticamente significativa na formação de complexos entre as amostras é indicativo da presença de CD20 na amostra de teste.

Já em um outro aspecto, a invenção fornece um animal não humano transgênico, tal como um camundongo transgênico, que expresse anticorpos monoclonais humanos que se ligam à CD20. Em uma forma de realização particular, o animal não humano transgênico é um camundongo transgênico tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana que codifica toda ou uma porção de um anticorpo da invenção. O animal não humano transgênico pode ser imunizado com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno de CD20 e/ou células que expressam CD20. Preferivelmente, o animal não humano transgênico, por exemplo, o camundongo transgênico, é capaz de produzir isótipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para CD20 (por exemplo, IgG, IgA e/ou IgM) passando por uma recombinação V-

D-J e mudança de isótipo. A mudança de isótipo pode ocorrer, por exemplo, pela mudança de isótipo clássica ou não clássica.

Conseqüentemente, já em um outro aspecto, a invenção fornece células B isoladas de um animal não humano transgênico como descrito acima, por exemplo, um camundongo transgênico, que expresse anticorpos anti-CD20 humanos. As células B isoladas podem ser depois imortalizadas pela fusão com uma célula imortalizada para fornecer uma fonte (por exemplo, um hibridoma) de anticorpos anti-CD20 humanos. Tais hibridomas (isto é, que produzem anticorpos anti-CD20 humanos) também estão incluídos dentro do escopo da invenção.

Como aqui exemplificado, os anticorpos humanos da invenção podem ser obtidos diretamente a partir dos hibridomas que expressam o anticorpo ou podem ser clonados e recombinantemente expressados em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula CHO, uma célula NS/0 ou uma célula linfocítica). Outros exemplos de células hospedeiras são microorganismos, tais como *E. coli* e fungos, tais como levedura. Alternativamente, elas podem ser produzidas recombinantemente em um animal não humano ou planta transgênicos. Conseqüentemente, em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos para produzir anticorpos monoclonais humanos que se ligam à CD20 humana. Em uma forma de realização, o método inclui imunizar um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, como anteriormente descrito (por exemplo, tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana que codificam todo ou uma porção de um anticorpo anti-CD20), com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno de CD20 humano e/ou células que expressam CD20 humanas. As células B (por exemplo, células B esplênicas) do animal são depois obtidas e fundidas com células de mieloma para formar células de hibridoma, imortais que secretam anticorpos monoclonais humanos contra

CD20.

Já em um outro aspecto, a invenção fornece moléculas de ácido nucléico que codificam anticorpos anti-CD20 humanos (por exemplo, suas regiões variáveis), assim como vetores de expressão recombinantes que incluem os ácidos nucléicos da invenção e células hospedeiras transfectadas com tais vetores. Os métodos de produzir os anticorpos cultivando-se estas células hospedeiras também são abrangidos pela invenção. Os ácidos nucléicos particulares fornecidos pela invenção compreendem as seqüências de nucleotídeo mostrados nas SEQ ID NOs: 1, 5 ou 9 e SEQ ID NOs: 3, 7 ou 11, que codificam as cadeias pesada e leve, respectivamente, de anticorpos anti-CD20 humanos 2F2, 7D8 e 11B8.

Outras características e vantagens da presente invenção estarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra o pCON γ 1f/vetor pesado variáveis usados para a produção recombinante dos anticorpos monoclonais humanos 2F2 e 11B8.

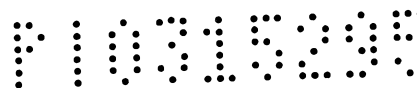
A Figura 2 mostra o pCON κ /vetor leve variável usado para a produção recombinante de 2F2 e 11B8.

A Figura 3 mostra o vetor de clonagem de gene duplo (pCON γ 1f/ κ 2F2) usados para a produção recombinante de 2F2 e 11B8.

A Figura 4 é um gráfico que compara a ligação de anticorpos monoclonais humanos 2F2, 7D8 e 11B8 às células NS/0 Raji, Daudi e CD20 transfectadas e as células NS/0 precursoras usando a citometria de fluxo.

As Figuras 5A e 5B mostram a ligação de 2F2 às PBMCs de três doadores humanos usando a citometria de fluxo.

Figura 6 é um gráfico que compara a afinidade de ligação de 2F2 rotulado com ^{125}I e 11B8 rotulado com ^{125}I com as células B Ramos-EHR.



As Figuras 7A e 7B mostram a ligação de 2F2 rotulado com ^{125}I e 11B8 rotulado com ^{125}I comparado com rituximab rotulado com ^{125}I (anticorpo quimérico anti-CD20, IDEC) e B1 rotulado com ^{125}I (o termo B1 corresponde à forma não rotulada de BexxarTM, que é um anticorpo anti-CD20 humano de murino rotulado com ^{131}I , Coulter) às células B Ramos-EHR (A) e células Daudi (B).

A Figura 8 é um gráfico que compara as taxas de dissociação de 11B8T rotulado com ^{125}I , 2F2 rotulado com ^{125}I , rituximab rotulado com ^{125}I (RIT) e B1 rotulado com ^{125}I .

A Figura 9 mostra as taxas de dissociação dos fragmentos F(ab')_2 de 2F2, 11B8T e rituximab em células B Ramos-EHR.

As Figuras 10A e 10B mostram a CDC pelo 2F2T, 11B8T, 7D8, rituximab e um anticorpo de controle isotópico (HuMab-KLH) de células Daudi (A) e células SU-DHL-4 (B) em diferentes pontos de tempo (*off-rate* funcional) usando a citometria de fluxo.

As Figuras 11A-E mostram as cinéticas de CDC induzidas pelo 2F2 e rituximab em linhagens de célula diferentes usando a citometria de fluxo.

As Figuras 12A-D mostram CDC induzida pelo 2F2 e rituximab em linhagens de célula diferentes como uma função da concentração de complemento (soro humano normal (NHS)) em duas concentrações de anticorpo diferentes usando a citometria de fluxo.

As Figuras 13A-D mostram a indução dependente da concentração de CDC pelo 2F2 e rituximab em linhagens de célula diferentes usando a citometria de fluxo.

Figuras 14A e 14B mostram a indução dependente da concentração de CDC pelo 2F2, 2F2T, 11B8T, B1 e rituximab em células Daudi (A) e células Raji (B).

As Figuras 15A e 15B são gráficos que comparam CDC de

células Daudi (células que expressam níveis baixos de CD55/59) pelos anticorpos monoclonais humanos 2F2, 7D8 e 11B8 e rituximab; (A) mostra a lise percentual de células não lavadas e (B) mostra a lise percentual de células que foram lavadas antes da adição de soro.

5 As Figuras 16A e 16B são gráficos que comparam CDC de células Raji (células que expressam nível altos de CD55/59) pelos anticorpos monoclonais humanos 2F2, 7D8 e 11B8 e rituximab; (A) mostra a lise percentual de células não bloqueadas com anticorpos anti-CD55 e anti-CD59 e (B) mostra a lise percentual de células bloqueadas com anticorpos anti-CD55 e anti-CD59.

10 As Figuras 17A-C mostram o papel de CD55 e CD59 em CDC induzida por 2F2 e rituximab em células Raji. (A) mostra a porcentagem de células lisadas na adição de anticorpo anti-CD55, (B) mostra a porcentagem de células lisadas na adição de anticorpo anti-CD59 e (C) mostra a
15 porcentagem de células lisadas na adição tanto de anticorpo anti-CD55 e anticorpo anti-CD59.

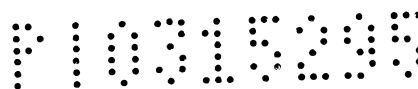
As Figuras 18A-D mostram a ligação de fator de complemento C1q por 2F2 e rituximab em linhagens de célula diferentes como determinado pela citometria de fluxo.

20 As Figuras 19A-D mostram a deposição de fragmento de fator de complemento C4c por 2F2 e rituximab em linhagens de célula diferentes como determinado pela citometria de fluxo.

A Figura 20 mostra a lise de células ARH-77 pelo 2F2, rituximab e 11B8T na presença de PMNs, MNCs, plasma ou sangue integral.

25 A Figura 21 mostra a lise de células B-CLL pelo 2F2, rituximab e 11B8T na presença de PMNs, MNCs, plasma ou sangue integral.

A Figura 22 mostra a lise de células HCL (leucemia de célula pilosa) pelo 2F2, rituximab e 11B8T na presença de PMNs, MNCs, plasma ou sangue integral.



A Figura 23 mostra a lise de células B-ALL pelo 2F2 e rituximab, na presença de PMNs, MNCs, plasma ou sangue integral.

A Figura 24 mostra a lise de células de linfoma folicular (FL) pelo 2F2, rituximab e 11B8T na presença de PMNs, MNCs, plasma ou sangue integral.

A Figura 25 mostra a lise de células linfoma de célula de manto pelo 2F2, rituximab e 11B8T na presença de PMNs, MNCs, plasma ou sangue integral.

A Figura 26 mostra a lise dependente da concentração de células ARH-77 pelo 2F2 e rituximab na presença de sangue integral.

A Figura 27 mostra a lise mediada por MNC de células ARH-77 pelo 2F2T, 11B8T e rituximab.

A Figura 28 mostra a lise mediada por MNC de células Raji pelo 2F2T, 11B8T e rituximab.

As Figuras 29A, B e C são gráficos que mostram a formação de cacho de CD20 nos balsas lipídicas na incubação com 2F2, 7D8 ou 11B8 usando a análise FRET e ensaio de insolubilidade em Triton-X.

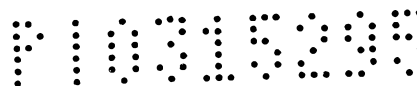
A Figura 30 mostra a formação de cacho de CD20 nos balsas lipídicas na incubação com 2F2, rituximab ou 11B8T usando a análise FRET.

A Figura 31 mostra a proporção de CD20 que permanece na fração de balsa insolúvel depois do tratamento com Triton X-100 (TX) e incubação com 2F2, rituximab ou 11B8T.

A Figura 32 mostra a distribuição de CD20 entre as frações de membrana em balsa e não balsa na estimulação de células Daudi com 2F2, rituximab ou 11B8T.

As Figuras 33A-G mostram a apoptose de células Daudi pelo 2F2, 7D8 e 11B8 usando a citometria de fluxo.

A Figura 34 mostra a indução da apoptose de células Raji pelo 2F2, 11B8T, rituximab ou B1 usando a citometria de fluxo.



A Figura 35A mostra a indução da apoptose de células Daudi pelo 2F2T, 11B8T, rituximab ou B1 usando a citometria de fluxo.

A Figura 35B mostra a apoptose em estágio inicial e estágio tardio de células Daudi pelos anticorpos monoclonais humanos 2F2T, 11B8T, rituximab e B1 usando a citometria de fluxo.

As Figuras 36A-E mostram a adesão homotípica de células B Ramos-EHR pelo 2F2, 7D8 e 11B8 usando microscopia ótica.

A Figura 37 mostra a adesão homotípica de células Daudi pelo 2F2, rituximab e B1 usando a microscopia ótica.

A Figura 38 é um gráfico que mostra a sobrevivência percentual de camundongos SCID injetados com células Daudi e tratadas com 2F2 ou 7D8.

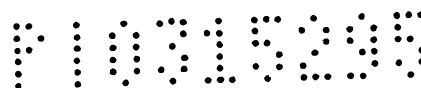
A Figura 39 mostra a porcentagem de sobrevivência de camundongos SCID injetados com células Tanoue e tratadas com 2F2, rituximab ou B1.

A Figura 40 mostra a sobrevivência percentual de camundongos SCID injetados com células Daudi e tratados com concentrações diferentes de 2F2 ou rituximab.

A Figura 41 mostra a sobrevivência percentual de camundongos SCID injetados com células Daudi e tratados com 11B8T ou B1.

A Figura 42 mostra a produção de imagem pela bioluminescência de células de tumor em camundongos SCID no dia 39 (31 dias depois do tratamento com 10 μ g de B1, rituximab, 11B8T, 2F2T ou huIgG1). A bioluminescência é representada na cor vermelha (as áreas escuras nos camundongos) (intensidade de luz > 50 fótons por 5 min) como a cobertura na imagem corporal em preto e branco dos camundongos.

A Figura 43 mostra a massa tumoral em cada camundongo quantificado no dia 25, 32, 39 e 46 a seguir da administração, no dia 8, de 10



μg de B1, rituximab, 11B8T, 2F2T ou huIgG1 pela integração dos sinais luminosos sobre a superfície corporal.

As Figuras 44A-C mostram a análise citométrica de fluxo de células CD20⁺ no sangue periférico de macacos cinomolgos a seguir da administração intravenosa de 2F2 ou rituximab nas dosagens diferentes, 4 x 1,25 mk/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B) ou 4 x 12,50 mg/kg (C).

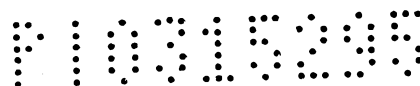
As Figuras 45A-C mostram a análise citométrica de fluxo de células CD21⁺ no sangue periférico de macacos cinomolgos a seguir da administração intravenosa de 2F2 ou rituximab nas dosagens diferentes, 4 x 1,25 mk/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B) ou 4 x 12,50 mg/kg (C).

As Figuras 46A-C mostram a análise citométrica de fluxo de células CD20⁺ em linfônodos de macacos cinomolgos a seguir da administração intravenosa de 2F2 ou rituximab nas dosagens diferentes, 4 x 1,25 mk/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B) ou 4 x 12,50 mg/kg (C).

As Figuras 47A-C mostram a análise citométrica de fluxo de CD20^{baixo}CD23⁺CD40^{alto} que expressam células no sangue periférico de macacos cinomolgos a seguir da administração intravenosa de 2F2 ou rituximab em dosagens diferentes, 4 x 1,25 mk/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B) ou 4 x 12,50 mg/kg (C).

As Figuras 48A-E mostram a ligação de rituximab (a), 2F2 (B), 11B8 (C), B1 (D) ou de um anticorpo de controle isotípico (E) às células CHO que expressam CD20 do tipo selvagem (WT), CD20 mutante (AxP) ou tanto CD20 WT quanto CD20 mutante (AxP) como determinado pela citometria de fluxo.

As Figuras 49A-F mostram a ligação percentual de 2F2, 11B8T, B1 ou rituximab a P172S mutante vs. CD20 WT (A), ligação percentual de 2F2T, 11B8T, B1, CAT (CAT 13.6E12, um anticorpo IgG2A anti-CD20 monoclonal de camundongo, Diatec.Com), um anticorpo isotípico de controle (KLH) ou rituximab a CD20 mutante (AxP) vs. CD20 WT (B), a



ligação percentual de 2F2, 11B8T, B1 ou rituximab ao N166D mutante vs. CD20 WT (C), ligação percentual de 2F2T, CAT ou rituximab ao N166D mutante vs. CD20 WT (D), ligação percentual de 2F2T, 2F2, 11B8T, B1 ou rituximab ao N163D mutante vs. CD20 WT (E) e ligação percentual de 2F2T, CAT ou rituximab ao N163D mutante vs. CD20 WT (F).

A Figura 50 mostra a ligação de 2F2T, 7D8 e anticorpo de controle isotípico, como determinado pelo ELISA, a três anticorpos anti-idiotípicos, anti-2F2 sab 1,1, anti-2F2 sab 1,2 e anti-2F2 sab 1,3, incitado contra 2F2.

A Figura 51 mostra a ligação de 11B8T, como determinado pelo ELISA, a anticorpos anti-idiotípicos, anti-11B8T sab 2,2, anti-11B8T sab 2,3, anti-11B8T sab 2,4, anti-11B8T sab 2,5 e anti-11B8T sab 2,6, incitados contra 11B8T, mas nenhuma ligação aos anticorpos anti-idiotípicos anti-2F2.

As Figuras 52A-C mostram ligação dose-dependente de 2F2T, como determinado pelo ELISA, a três anticorpos anti-idiotípicos, anti-2F2 sab 1,1 (a), anti-2F2 sab 1,2 (B) e anti-2F2 sab 1,3 (C), incitados contra 2F2.

A Figura 53 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 2) da região V de cadeia pesada e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 4) da região de cadeia V (capa) leve de anticorpo monoclonal humano 2F2 com regiões CDR designadas.

A Figura 54 mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 1) da região V de cadeia pesada e a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 3) da região de cadeia V (capa) leve de anticorpo monoclonal humano 2F2.

A Figura 55 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 6) da região V de cadeia pesada e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 8) da região de cadeia V (capa) leve de anticorpo monoclonal humano 7D8 com as regiões CDR designadas.

A Figura 56 mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 5) da região V de cadeia pesada e a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 7)

da região V de cadeia (capa) leves de anticorpo monoclonal humano 7D8.

A Figura 57 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 10) da região V de cadeia pesada e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 12) da região V de cadeia (capa) leve de anticorpo monoclonal humano 11B8 com as regiões CDR designadas.

A Figura 58 mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 9) da região V de cadeia pesada e da sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 11) da região V de cadeia (capa) leve de anticorpo monoclonal humano 11B8.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece terapias com base em anticorpo melhoradas para o tratamento e diagnóstico de uma variedade de distúrbios que envolvem as células que expressam CD20. As terapias da invenção utilizam anticorpos monoclonais humanos isolados que especificamente se ligam a um epítopo presente na CD20. Os anticorpos monoclonais humanos isolados abrangidos pela presente invenção incluem os anticorpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD.

Em uma forma de realização o anticorpo é um anticorpo IgG1, mais particularmente um isótipo IgG1, κ ou IgG1, λ . Em uma outra forma de realização o anticorpo é um anticorpo IgG3, mais particularmente um isótipo IgG3, κ ou IgG3, λ . Já em uma outra forma de realização o anticorpo é um anticorpo IgG4, mais particularmente um isótipo IgG4, κ ou IgG4, λ . Ainda em uma outra forma de realização o anticorpo é um anticorpo IgA1 ou IgA2.

Ainda em uma outra forma de realização o anticorpo é um anticorpo IgM.

Em uma forma de realização, os anticorpos humanos são produzidos em um animal transgênico não humano, por exemplo, um camundongo transgênico, capaz de produzir isótipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para CD20 passando por uma recombinação V-D-J e mudança de isótipo. Conseqüentemente, os aspectos da invenção incluem não

apenas anticorpos, fragmentos de anticorpo e suas composições farmacêuticas, mas também animais transgênicos não humanos, as células B, transfectomas de célula hospedeira e hibridomas que produzem anticorpos monoclonais. Tal animal transgênico também pode ser um coelho transgênico para produzir anticorpos policlonais tais como divulgados na US 2003/0017534. Conseqüentemente, a invenção também abrange anticorpos policlonais humanos que especificamente se ligam a CD20. Em uma forma de realização a invenção diz respeito aos anticorpos policlonais que se ligam a um epítipo em CD20 (i) que não compreendem ou requerem o resíduo de aminoácido prolina na posição 172; (ii) que não compreendem ou requerem os resíduos de aminoácido alanina na posição 170 ou prolina na posição 172; (iii) que compreende ou requer os resíduos de aminoácido asparagina na posição 163 e asparagina na posição 166; (iv) que não compreendem ou requerem o resíduo de aminoácido prolina na posição 172, mas que compreendem ou requerem os resíduos de aminoácido asparagina na posição 163 e asparagina na posição 166; ou (v) que não compreendem ou requerem os resíduos de aminoácido alanina na posição 170 ou prolina na posição 172, mas que compreendem ou requerem os resíduos de aminoácido asparagina na posição 163 e asparagina na posição 166.

Em uma outra forma de realização a invenção diz respeito a anticorpos policlonais humanos que têm uma ou mais das seguintes características: (i) ligam-se ao P172S CD20 mutante (prolina na posição 172 mutada para serina) com pelo menos a mesma afinidade como para as CD20 humanas; (ii) ligam-se ao mutante AxP (alanina na posição 170 mutada para serina e prolina na posição 172 mutada para serina) com pelo menos a mesma afinidade como para as CD20 humanas; (iii) mostram uma ligação reduzida de 50 % ou mais ao mutante N166D (asparagina na posição 166 mutada para ácido aspártico) para as CD20 humanas em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml; e/ou (iv) mostram uma ligação reduzida de 50 % ou mais para

N163D mutante (asparagina na posição 163 mutada para ácido aspártico) comparado com as CD20 humanas em uma concentração de anticorpo de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Já em uma outra forma de realização a invenção diz respeito aos anticorpos policlonais humanos que se ligam a um epítopo na alça extracelular primeira pequena de CD20 humanas. Ainda em uma outra forma de realização a invenção também abrange anticorpos policlonais humanos que se ligam a um epítopo descontínuo na CD20. Em uma outra forma de realização a invenção diz respeito aos anticorpos policlonais humanos que se ligam a um epítopo descontínuo na CD20, que tem parte da primeira alça extracelular pequena e parte da segunda alça extracelular. Ainda em uma outra forma de realização a invenção diz respeito aos anticorpos policlonais humanos que se ligam a um epítopo descontínuo em CD20, que tem resíduos AGIYAP da alça extracelular primeira pequena e resíduos MESLNFIRAHTPYI da segunda alça extracelular.

Os métodos de usar os anticorpos da invenção para detectar uma célula que expressam CD20 são abrangidos pela invenção. Os métodos de usar os anticorpos da invenção para bloquear ou inibir as atividades induzidas pela CD20, por exemplo, atividades proliferativas e/ou de diferenciação, também são fornecidos e são úteis no tratamento de distúrbios associados com CD20, tais como doenças tumorigênicas (por exemplo, linfoma de célula B) e doenças autoimunes (por exemplo, RA, doença de Crohn e granulomatose de Wegener).

de modo que a presente invenção possa ser mais prontamente entendida, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são apresentadas por toda a descrição detalhada.

Os termos “CD20” e “antígeno de CD20” são usados aqui intercambiavelmente e incluem quaisquer variantes, isoformas e espécies homólogas de CD20 humanas que são naturalmente expressadas pelas células



ou são expressadas em células transfectadas com o gene CD20. A ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno de CD20 medeia a morte de células que expressam CD20 (por exemplo, uma célula de tumor) pela inativação de CD20. A morte da células que expressam CD20 pode ocorrer por um ou mais dos seguinte mecanismos:

citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células que expressam CD20;

apoptose de células que expressam CD20;

fagocitose de célula efetora de células que expressam CD20;

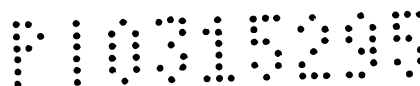
ou

citotoxicidade celular dependente de anticorpo de célula efetora (ADCC) de células que expressam CD20.

Sinônimo de CD20, como reconhecido na técnica, incluem CD20 antígeno de linfócito B, antígeno de superfície B1 de linfócito B, Leu-16, Bp35, BM5 e LF5.

Como aqui usado, o termo “inibe o crescimento” (por exemplo, referindo-se às células) é intencionado a incluir qualquer diminuição mensurável no crescimento da célula quando contatada com um anticorpo anti-CD20 quando comparado ao crescimento das mesmas células não em contato com um anticorpo anti-CD20, por exemplo, a inibição de crescimento de uma cultura de célula em pelo menos cerca de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % ou 100 %. Uma tal diminuição no crescimento de célula pode ocorrer por uma variedade de mecanismos, por exemplo, fagocitose efetora de célula, ADCC, CDC, e/ou apoptose.

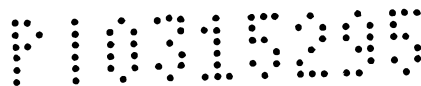
O termo “balsa” refere-se aos microdomínios de membrana ricos em esfingolipídeo e colesterol localizados na área de folíolo externo da membrana plasmática de uma célula. A capacidade de certas proteínas para se associar dentro de tais domínios pode afetar a função da proteína. Por exemplo, a translocação de moléculas CD20 em balsas lipídicas, depois de ser



ligado pelos anticorpos humanos da presente invenção, cria uma alta densidade de complexos de anticorpo de antígeno de CD20 nas membranas plasmáticas. Uma tal densidade alta de complexos de anticorpo de antígeno de CD20 podem permitir a ativação eficiente do sistema de complemento durante CDC.

O termo “anticorpo” como aqui aludido inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação de antígeno (isto é, “porção de ligação de antígeno”) ou cadeia única destes. Um “anticorpo” refere-se a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas pelas ligações de dissulfeto ou uma porção de ligação de antígeno destas. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como V_L) e uma região constante de cadeia leve. As regiões V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinadoras de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de esqueleto (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir do término amino para o término carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

O termo “porção de ligação de antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente “porção de anticorpo”), como aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade para se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, CD20). Foi mostrado que a



função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada pelos fragmentos de um anticorpo de tamanho natural. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo “porção de ligação de antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que

5 consiste dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd que consiste dos domínios V_H e C_{H1} ; (iv) um fragmento Fv que consiste dos domínios V_L e V_H de um único ramo de um anticorpo, (v) um fragmento dAb

10 (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544 a 546), que consiste de um domínio V_H ; (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) e (vii) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que podem ser opcionalmente unidas por um ligador sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , são codificados por genes separados,

15 eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que permite que eles sejam fabricados como uma cadeia de proteína única em que as regiões V_L e V_H se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); ver por exemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423 a 426; e Huston *et al.* (1988) Proc. Natl.

20 Acad. Sci. USA 85: 5879 a 5883). Tais anticorpos de cadeia única também estão intencionados a serem abrangidos dentro do termo “porção de ligação de antígeno” de um anticorpo. Um outro exemplo é o domínio de ligação das proteínas de fusão de imunoglobulina que compreendem (i) um domínio de ligação do polipeptídeo que é fundido a um polipeptídeo da região de articulação de imunoglobulina, (ii) uma região constante CH2 de cadeia pesada da imunoglobulina fundida à região de articulação e (iii) uma região constante CH3 de cadeia pesada da imunoglobulina fundida à região constante CH2. O domínio de ligação do polipeptídeo pode ser uma região

25 variável de cadeia pesada ou uma região variável de cadeia leve. As proteínas



de fusão do domínio de ligação de imunoglobulina são ainda divulgados na US 2003/0118592 e US 2003/0133939. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas por aqueles com habilidade na técnica e os fragmentos são triados quanto a utilidade da mesma maneira como o são os anticorpos intactos.

O termo “epítopo” significa uma proteína determinante capaz de ligação específica a um anticorpo. Os epítopos usualmente consistem de agrupamentos de superfície quimicamente ativa de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e usualmente têm características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Epítopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos em que a ligação ao primeiro mas não ao último é perdida na presença de solventes desnaturantes.

O termo “epítopo descontínuo,” como aqui usado, significa um epítopo conformacional em um antígeno de proteína que é formado de pelo menos duas regiões separadas na sequência primária da proteína.

O termo “molécula biespecífica” é intencionada a incluir qualquer agente, por exemplo, uma proteína, peptídeo ou complexo de proteína ou peptídeo, que tenham duas especificidades de ligação diferentes. Por exemplo, a molécula pode se ligar ou interagir com, (a) um antígeno de superfície celular e (b) um receptor Fc na superfície de um célula efetora. O termo “molécula multiespecífica” ou “molécula heteroespecífica” é intencionado a incluir qualquer agente, por exemplo, uma proteína, peptídeo ou complexo de proteína ou peptídeo, que tem mais do que duas especificidades de ligação diferentes. Por exemplo, a molécula pode se ligar ou interagir com, (a) um antígeno de superfície celular, (b) um receptor Fc na superfície de uma célula efetora e (c) pelo menos um outro componente. Conseqüentemente, a invenção inclui, mas não é limitada às moléculas biespecíficas, trisespecíficas, tetraespecíficas e outras multiespecíficas que são

direcionadas aos antígenos de superfície celular, tais como CD20 e a outros alvos, tais como receptores Fc nas células efectoras.

O termo “anticorpos biespecíficos” também inclui diacorpos. Os diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos em que os domínios V_H e V_L são expressados em uma única cadeia de polipeptídeo, mas usando um ligador que é muito curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando deste modo os domínios a emparelharem com domínios complementares de uma outra cadeia e criando dos sítios de ligação de antígeno (ver por exemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 a 6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) Structure 2: 1121 a 1123).

O termo “derivados de anticorpo humano” refere-se a qualquer forma modificada do anticorpo, por exemplo, um conjugado do anticorpo e um outro agente ou anticorpo.

Como aqui usado, um anticorpo humano é “derivado de” uma sequência de linha germinativa particular se o anticorpo é obtido a partir de um sistema usando seqüências da imunoglobulina humana, por exemplo, imunizando-se um camundongo transgênico que carrega os genes da imunoglobulina humana ou triando-se uma biblioteca de gene da imunoglobulina humana e em que o anticorpo humano selecionado é pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, ainda mais preferivelmente pelo menos 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntico na seqüência de aminoácido à seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina da linha germinativa. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma seqüência da linha germinativa humana particular não demonstrará mais do que 10 diferenças de aminoácido, mais preferivelmente, não mais do que 5 ou ainda mais preferivelmente, não mais do que 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina da linha germinativa.

Como aqui usado, o termo “heteroanticorpos” refere-se a dois ou mais anticorpos, derivados destes ou regiões de ligação de antígeno ligadas juntas, pelo menos dois dos quais têm especificidades diferentes. Estas especificidades diferentes incluem uma especificidade de ligação a um receptor Fc em uma célula efetora e uma especificidade de ligação para um antígeno ou epítipo em uma célula alvo, por exemplo, uma célula de tumor.

O termo “anticorpo humano”, como aqui usado, é intencionado a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências da imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas seqüências da imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, as mutações introduzidas pela mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo “anticorpo humano”, como aqui usado, não é intencionado a incluir anticorpos em que as seqüências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie de mamífero, tal como um camundongo, foram enxertadas nas seqüências de esqueleto humanas.

Os termos “anticorpo monoclonal” ou “composição de anticorpo monoclonal” como aqui usado refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal demonstra uma especificidade de ligação única e afinidade a um epítipo particular. Conseqüentemente, o termo “anticorpo monoclonal humano” refere-se aos anticorpos que demonstram uma especificidade de ligação única que têm regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências da imunoglobulina da linha germinativa humana. Em uma forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidas por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico ou transcromossômico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia

pesada humana e um transgene de cadeia leve fundidos a uma célula imortalizada.

O termo “anticorpo humano recombinante”, como aqui usado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressados, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para os genes da imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir destes (descrito ainda na Seção I, abaixo), (b) anticorpos isolados a partir de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, de um transfectoma, (c) anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpo humano recombinante, combinatória e (d) anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a junção de seqüências de gene da imunoglobulina humana a outras seqüências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas a partir de seqüências da imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas formas de realização, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para as seqüências Ig humanas é usado, mutagênese somática *in vivo*) e assim as seqüências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas e das seqüências V_H e V_L da linha germinativa humana e a elas relacionadas, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinativa de anticorpo humano *in vivo*.

O termo “transfectoma”, como aqui usado, inclui célula hospedeira eucariótica recombinante que expressa o anticorpo, tal como células CHO, células NS/0, células HEK293, células vegetais ou fungos, incluindo células de levedura.

Como aqui usado, um “anticorpo heterólogo” é definido em

relação ao organismo não humano transgênico que produz um tal anticorpo. Este termo refere-se a um anticorpo tendo uma sequência de aminoácido ou um que codifica sequência de ácido nucléico correspondente àquela encontrada em um organismo que não consiste do animal não humano transgênico e no geral de uma espécie outra que não aquela do animal não humano transgênico.

Como aqui usado, um “anticorpo heteroíbrido” refere-se a um anticorpo tendo cadeias leve e pesada de origens de organismos diferentes. Por exemplo, um anticorpo tendo uma cadeia pesada humana associada com uma cadeia leve de murino é um anticorpo heteroíbrido. Os exemplos de anticorpos heteroíbridos incluem anticorpos quiméricos e humanizados, debatidos supra.

Um “anticorpo isolado,” como aqui usado, é intencionado a referir-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades angiogênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se liga à CD20 é substancialmente livre de anticorpos que especificamente se ligam a antígenos outros que não CD20). Um anticorpo isolado que especificamente se liga a um epítopo, isoforma ou variante de CD20 humana, entretanto, pode ter reatividade cruzada com outros antígenos relacionados, por exemplo, de outras espécies (por exemplo, homólogos de espécies CD20). Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos. Em uma forma de realização da invenção, uma combinação de anticorpos monoclonais “isolados” tendo especificidades diferentes são combinados em uma composição bem definida.

Como aqui usado, “ligação específica” refere-se à ligação de anticorpo a um antígeno pré determinado. Tipicamente, o anticorpo se liga com uma afinidade que corresponde a um K_D de cerca de 1×10^{-7} M ou menos e liga-se ao antígeno pré determinado com uma afinidade que

corresponde a um K_D que é pelo menos duas ordens de magnitude mais baixa do que a sua afinidade quanto a ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) outros que não o antígeno pré determinado ou um antígeno intimamente relacionado. As frases “um anticorpo que reconhece um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são aqui usados intercambiavelmente com o termo “um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno”.

Como aqui usado, o termo “ k_d ” (s^{-1}), como aqui usado, é intencionado a referir-se à constante de taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. O dito valor também é aludido como o valor k_{off} .

O termo “ k_a ” ($M^{-1} \times s^{-1}$), como aqui usado, é intencionado a referir-se à constante de taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular.

O termo “ K_D ” (M), como aqui usado, é intencionado a referir-se à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

O termo “ K_A ” (M^{-1}), como aqui usado, é intencionado a referir-se à constante de equilíbrio de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular e é obtida dividindo-se o k_a pelo k_d .

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

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

Como aqui usado, “isótipo não mudada” refere-se à classe isotípica de cadeia pesada que é produzida quando nenhuma mudança de isótipo ocorreu; o gene CH que codifica o isótipo não mudado é tipicamente o

primeiro gene CH imediatamente a jusante do gene VDJ funcionalmente rearranjado. A mudança de isótipo tem sido classificada como mudança de isótipo clássica ou não clássica. A mudança de isótipo clássica ocorre pelos eventos de recombinação que envolvem pelo menos uma região de sequência de troca no transgene. A mudança de isótipo não clássica pode ocorrer, por exemplo, pela recombinação homóloga entre σ_μ humano e Σ_μ humano (supressão associada a δ). Os mecanismos de comutação não clássica alternativos, tais como recombinação de intertransgene e/ou intercromossômica, entre outros, podem ocorrer e efetuar a mudança de isótipo.

Como aqui usado, o termo “sequência de comutação” refere-se àquelas sequências de DNA responsáveis pela recombinação de comutação. Uma sequência “doadora de comutação”, tipicamente uma região de comutação μ , estará a 5' (isto é, a montante) da região de construção a ser suprimida durante a recombinação de comutação. A região aceitadora de comutação estará entre a região de construção a ser suprimida e a região constante de recolocação (por exemplo, γ , ϵ , etc.). Como não existe nenhum sítio específico onde a recombinação sempre ocorre, a sequência de gene final tipicamente não será prognosticável a partir da construção.

Como aqui usado, “padrão de glicosilação” é definido como o padrão de unidades de carboidrato que são covalentemente ligados a uma proteína, mais especificamente a uma proteína de imunoglobulina (anticorpo). Um padrão de glicosilação de um anticorpo heterólogo pode ser caracterizado como sendo substancialmente similar aos padrões de glicosilação que ocorrem naturalmente em anticorpos produzidos pelas espécies do animal transgênico não humano, quando uma pessoa de habilidade na técnica reconheceria o padrão de glicosilação do anticorpo heterólogo como sendo mais similar ao dito padrão de glicosilação nas espécies do animal transgênico não humano do que nas espécies das quais os genes CH do transgene foram

derivados.

O termo “que ocorre naturalmente” como aqui usado como aplicado a um objeto refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma seqüência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que estão presentes em um organismo (incluindo vírus) que podem ser isoladas a partir de uma fonte na natureza e que não foram intencionalmente modificadas pelo homem no laboratório é a que ocorre naturalmente.

O termo “rearranjado” como aqui usado refere-se a uma configuração de um local de imunoglobulina de cadeia pesada ou cadeia leve em que um segmento V é posicionado imediatamente adjacente a um segmento D-J ou J em uma conformação que codifica essencialmente um domínio V_H ou V_L completo, respectivamente. Um local de gene de imunoglobulina (anticorpo) rearranjado pode ser identificado em comparação com o DNA da linha germinativa; um local rearranjado terá pelo menos um elemento de homologia heptamérica/nonamérica recombinado.

O termo “não rearranjado” ou “configuração de linha germinativa” como aqui usado em referência a um segmento V refere-se à configuração em que o segmento V não é recombinado de modo a ser imediatamente adjacente a um segmento D ou J.

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

O termo “molécula de ácido nucléico, isolada” como aqui usado em referência aos ácidos nucléicos que codificam anticorpos inteiros ou porções de anticorpo (por exemplo, V_H , V_L , CDR3) que se ligam a CD20, é intencionado a referir-se a uma molécula de ácido nucléico em que as seqüências de nucleotídeo que codificam o anticorpo inteiro ou porção de anticorpo são livres de outras seqüências de nucleotídeo que codificam



anticorpos inteiros ou porções de anticorpo que se ligam aos antígenos outros que não CD20, outras seqüências estas que podem flanquear naturalmente o ácido nucléico no DNA genômico humano. Em uma forma de realização, o anticorpo anti-CD20 humano inclui a seqüência de nucleotídeo ou aminoácido de 2F2, 7D8 ou 11B8, assim como as regiões variáveis de cadeia pesada (V_H) e cadeia leve (V_L) tendo as seqüências mostradas nas SEQ ID NOs: 1, 5 ou 9 e SEQ ID NOs: 3, 7 ou 11, respectivamente.

Como aqui divulgados e reivindicados, as seqüências apresentadas nas SEQ ID NOs: 1 a 30 incluem “modificações de seqüência conservativas,” isto é, modificações de seqüência de nucleotídeo e aminoácido que não afetam ou alteram significativamente a ligação de características do anticorpo codificado pela seqüência de nucleotídeo ou contendo a seqüência de aminoácido. Tais modificações de seqüências conservativas incluem substituições, adições e supressões de nucleotídeo e aminoácido. As modificações podem ser introduzidas nas SEQ ID NOs: 1 a 30 pelas técnicas padrão conhecidas no ramo, tais como mutagênese direcionada a sítio e mutagênese mediada a PCR. As substituições de aminoácido conservativas incluem aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial prognosticado em um



anticorpo anti-CD20 humano é preferivelmente substituído com um outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral.

A presente invenção também abrange “derivados” das seqüências de aminoácido como apresentadas nas SEQ ID NOS: 1 a 30 e suas modificações de seqüência conservativas, em que um ou mais dos resíduos de aminoácido foram derivatizados, por exemplo, pela acilação ou glicosilação, sem afetar ou alterar significativamente as características de ligação do anticorpo contendo as seqüências de aminoácido.

Além disso, a presente invenção compreende anticorpos em que as alterações foram feitas na região Fc de modo a mudar as propriedades funcionais ou farmacocinéticas dos anticorpos. Tais alterações podem resultar em uma diminuição ou aumento da ligação C1q e CDC ou da ligação Fc γ R e ADCC. As substituições, por exemplo, podem ser feitas em um ou mais dos resíduos de aminoácido nas posições 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 da região constante de cadeia pesada, causando deste modo uma alteração em uma função efetora enquanto retém a capacidade para ligar-se ao antígeno quando comparado com o anticorpo não modificado, conforme a US 5.624.821 e US 5.648.260.

A meia vida *in vivo* dos anticorpos também pode ser melhorada modificando-se o epítopo de receptor selvagem do domínio constante de Ig ou um domínio constante como Ig tal que a molécula não compreenda um domínio CH2 inteiro ou uma região Fc de Ig inteira, conforme US 6.121.022 e US 6.194.551. A meia vida *in vivo* além disso pode ser aumentada realizando-se mutações na região Fc, por exemplo, substituindo-se a treonina no lugar da leucina na posição 252, substituindo-se a treonina no lugar da serina na posição 254 ou substituindo-se a treonina no lugar da fenilalanina na posição 256, conforme a US 6.277.375.

Além disso, o padrão de glicosilação dos anticorpos podem ser modificados de modo a mudar a função efetora dos anticorpos. Por exemplo,



os anticorpos podem ser expressados em um transfectoma que não adiciona a unidade de fucose normalmente ligada a Asn na posição 297 da região Fc de modo a realçar a afinidade da região Fc para Fc γ RIII que, por sua vez, resultará em uma ADCC aumentada dos anticorpos na presença de células NK, conforme Shield *et al.* (2002) JBC, 277: 26733. Além disso, a modificação de galactosilação pode ser feita de modo a modificar a CDC.

Alternativamente, em uma outra forma de realização, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente junto a todo ou parte de uma seqüência codificadora de anticorpo anti-CD20, tal como pela mutagênese de saturação e os anticorpos anti-CD20 resultantes modificados podem ser triados quanto a atividade de ligação.

Conseqüentemente, os anticorpos codificados pelas (região variável de cadeia pesada e leve) seqüências de nucleotídeo aqui divulgadas e/ou contendo as (região variável de cadeia pesada e leve) seqüências de aminoácido aqui divulgadas (isto é, as SEQ ID NOs: 1 a 30) incluem anticorpos substancialmente similares codificados por ou contendo seqüências similares que foram conservativamente modificadas. Outro debate a cerca de como tais anticorpos substancialmente similares podem ser gerados com base nas seqüências parciais (isto é, regiões variáveis de cadeia pesada e leve) aqui divulgadas como as SEQ ID Nos: 1 a 30 é fornecido abaixo.

Para ácidos nucléicos, o termo "homologia substancial" indica que dois ácidos nucléicos ou seqüências designadas destes, quando otimamente alinhadas e comparadas, são idênticas, com as inserções ou supressões de nu apropriadas, em pelo menos cerca de 80 % dos nucleotídeos, usualmente de pelo menos cerca de 90 % a 95 % e mais preferivelmente de pelo menos cerca de 98 % a 99,5 % dos nucleotídeos. Alternativamente, a homologia substancial existe quando os segmentos hibridizarão e sob condições de hibridização seletivas, ao complemento do filamento.

Para as seqüências de nucleotídeo e de aminoácido, o termo



“homologia” indica o grau de identidade entre duas seqüências de ácido nucléico ou aminoácido quando otimamente alinhadas e comparadas com inserções ou supressões apropriadas. Alternativamente, a homologia substancial existe quando os segmentos de DNA hibridizarão sob condições de hibridização seletivas, ao complemento do filamento.

A identidade percentual entre duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, % homologia = # de posições idênticas/ # total de posições x 100), levando-se em conta o número de intervalos e o comprimento de cada intervalo, que necessitam ser introduzidos para o alinhamento ótimo das duas seqüências. A comparação de seqüências e a determinação da identidade percentual entre as duas seqüências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não limitantes abaixo.

A identidade percentual entre duas seqüências de nucleotídeo pode ser determinada usando o programa GAP no pacote de software GCG (disponível no <http://www.gcg.com>), usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um valor de intervalo de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um valor de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. A identidade percentual entre duas seqüências de nucleotídeo ou aminoácido também pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11 a 17 (1988)) que foi incorporada no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduo de valor PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Além disso, a identidade percentual entre duas seqüências de aminoácido pode ser determinada usando o Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444 a 453 (1970)) algoritmo que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível no <http://www.gcg.com>), usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um valor de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um valor de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.



As seqüências de ácido nucléico e proteína da presente invenção podem ser usadas ainda como uma “seqüência dúvida” para realizar uma pesquisa contra as bases de dados públicas, por exemplo, para identificar seqüências relacionadas. Tais procuras podem ser realizadas usando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 a 410. As procuras de nucleotídeo BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, pontuação = 100, comprimento da palavra = 12 para obter seqüências de nucleotídeo homólogas às moléculas de ácido nucléico da invenção. as procuras de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento da palavra = 3 para obter as seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de proteína da invenção. Para obter alinhamentos com intervalo com propósitos de comparação, o Gapped BLAST podem ser utilizados como descrito em Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389 a 3402. Quando da utilização dos programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros de default dos programas respectivos (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Os ácidos nucléicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado de célula ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucléico é “isolado” ou “tornado substancialmente puro” quando purificado livre de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucléicos ou proteínas celulares, pelas técnicas padrão, incluindo o tratamento alcalino/SDS, bandeamento de CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outras bem conhecidos na técnica. Ver, F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nova Iorque (1987).

As composições de ácido nucléico da presente invenção, embora freqüentemente em uma seqüência nativa (exceto quanto aos sítios de



restrição modificados e outros), de cDNA, genômica ou misturas destas, podem ser mudadas de acordo com técnicas padrão para fornecer seqüências de gene. Para as seqüências codificadoras, estas mutações, podem afetar a seqüência de aminoácido como desejado. Em particular, as seqüências de

5 DNA substancialmente homólogas ou derivadas de V, D, J nativas, constantes, mudadas e outras tais seqüências aqui descritas são consideradas (onde “derivado” indica que uma seqüência é idêntica ou modificada a partir de uma outra seqüência).

Um ácido nucléico está “operavelmente ligado” quando ele é

10 colocado em uma relação funcional com uma outra seqüência de ácido nucléico. Por exemplo, um promotor ou realçador está operavelmente ligado a uma seqüência codificadora se ele afeta a transcrição da seqüência. Com respeito à transcrição de seqüências reguladoras, operavelmente ligadas significa que as seqüências de DNA que são ligadas são contíguas e, onde

15 necessário unir duas regiões codificadora de proteína, contíguas e na matriz de leitura. Para as seqüências mudadas, operavelmente ligadas indica que as seqüências são capazes de efetuar a recombinação de mudança.

O termo “vetor,” como aqui usado, é intencionado a referir-se a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar um outro ácido

20 nucléico ao qual ele foi ligado. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a uma alça de DNA de filamento duplo circular na qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Um outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira

25 na qual eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos epissômicos). Outros vetores (por exemplo, vetores mamíferos não epissômicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira na introdução na célula hospedeira e deste modo são replicados junto com o genoma hospedeiro.



Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles são operativamente ligados. Tais vetores são aqui aludidos como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente, “vetores de expressão”). No geral, vetores de expressão de utilidade nas técnicas de DNA recombinante estão freqüentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados intercambiavelmente visto que o plasmídeo é a forma mais habitualmente usada de vetor. Entretanto, a invenção é intencionada a incluir outras de tais formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus defeituosos de replicação, adenovírus e vírus associados a adeno), que servem a funções equivalentes.

O termo “célula hospedeira recombinantes” (ou simplesmente “célula hospedeira”), como aqui usado, é intencionado a referir-se a uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos são intencionados a referir-se não apenas à célula objeto particular mas à progênie de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer nas gerações sucessivas devido à mutação ou influências ambientais, tal progênie, de fato, não pode ser idêntica à célula precursora, mas ainda estão incluídas dentro do escopo do termo “célula hospedeira” como aqui usado. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, transfectomas, tais como células CHO, células NS/0 e célula linfocíticas.

Como aqui usado, o termo “paciente” inclui qualquer animal humano ou não humano. O termo “animal não humano” inclui todos vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelha, cachorro, vaca, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

O termo “animal não humano, transgênico” refere-se a um animal não humano tendo um genoma que compreende um ou mais transgenes de cadeias pesada e/ou leve humanas ou transcromossomas



(integrados ou não integrados no DNA genômico natural do animal) e que é capaz de expressar anticorpos totalmente humanos. Por exemplo, um camundongo transgênico pode ter um transgene de cadeia leve humana e um transgene de cadeia pesada humana ou transcromossoma de cadeia pesada humana, tal que o camundongo produza anticorpos anti-CD20 humanos quando imunizado com o antígeno de CD20 e/ou células que expressam CD20. O transgene de cadeia pesada humana pode ser integrado no DNA cromossômico do camundongo, como é o caso para transgênico, por exemplo, camundongos HuMAb, tais como camundongos HCo7 ou HCo12 ou o transgene de cadeia pesada humana pode ser mantido extracromossomicamente, como é o caso para camundongos transcromossômicos (por exemplo, KM) como descritos na WO 02/43478. Tais camundongos transgênicos e transcromossômicos são capazes de produzir isótipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para CD20 (por exemplo, IgG, IgA e/ou IgE) passando pela recombinação V-D-J e mudança de isótipo.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas seguintes subseções.

I. Produção de Anticorpos Humanos para CD20

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo a metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein, Nature 256: 495 (1975). Embora os procedimentos de hibridização de célula somática sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser utilizadas, por exemplo, a transformação viral ou oncogênica de linfócitos B ou técnicas de demonstração de fago usando bibliotecas de genes de anticorpo humano.

O sistema animal preferido para preparar hibridomas que



secretam anticorpos monoclonais humanos é o sistema de murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos de imunização e técnicas para a isolamento de esplenócitos imunizados para a fusão são conhecidos na técnica. Os parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e os procedimentos de fusão também são conhecidos.

Em uma forma de realização preferida, os anticorpos monoclonais humanos direcionados contra CD20 podem ser gerados usando camundongos transgênico ou transcromossômico que carregam partes do sistema imune humano ao invés do sistema de camundongo. Estes camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos aqui aludidos como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente e são aqui coletivamente aludidos como “camundongos transgênicos.”

O camundongo HuMAb contém um minilocal de gene da imunoglobulina humana que codifica as seqüências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e leve κ humanas não rearranjadas, junto com mutações alvejadas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856 a 859). Conseqüentemente, os camundongos exibem a expressão reduzida de camundongo IgM ou κ e em resposta à imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanas introduzidos, passam pela mudança de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgG κ humanos de alta afinidade (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49 a 101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65 a 93 e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764: 536 a 546). A preparação de camundongos HuMAb está descrita em detalhes em Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287 a 6295; Chen, J. *et al* (1993) *International Immunology* 5: 647 a 656; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152: 2912 a 2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature*

- 368(6474): 856 a 859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49 a 101; Taylor, L. *et al.* (1994) International Immunology 6: 579 a 591; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65 a 93; Harding, F. e Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536 a 546; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845 a 851. Ver ainda, US N^{os} 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.877.397, 5.661.016, 5.814.318, 5.874.299, e 5.770.429, todas concedidas a Lonberg e Kay, assim como US 5.545.807 concedida a Surani *et al.*; WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 e WO 01/09187.

O camundongo KM contém um transcromossoma de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve capa humana. Os genes de cadeia pesada e leve de camundongo endógenos também foram rompidos nos camundongos KM tal que a imunização dos camundongos leva à produção de imunoglobulinas humanas ao invés de imunoglobulinas de camundongo. A construção de camundongos KM e seu uso para incitar imunoglobulinas humanas está descrita em detalhes na WO 02/43478.

Imunizações

- Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para CD20, camundongos transgênicos ou transcromossômicos contendo genes da imunoglobulina humana (por exemplo, camundongos HCo12, HCo7 ou KM) podem ser imunizados com uma preparação enriquecida de antígeno de CD20 e/ou células que expressam CD20, como descrito, por exemplo, por Lonberg *et al.* (1994), supra; Fishwild *et al.* (1996), supra e na WO 98/24884. Alternativamente, os camundongos podem ser imunizados com DNA que codifica CD20 humana. Preferivelmente, os camundongos terão de 6 a 16 semanas de idade na primeira infusão. Por exemplo, uma preparação enriquecida (5 a 50 µg) do antígeno de CD20 pode ser usada para imunizar os camundongos HuMAb intraperitonealmente. No evento em que as

imunizações usando uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno de CD20 não resulte em anticorpos, os camundongos também podem ser imunizados com células que expressam CD20, por exemplo, uma linhagem de célula, para promover respostas imunes.

- 5 A experiência acumulativa com vários antígenos tem mostrado que os camundongos transgênicos HuMAb respondem melhor quando inicialmente imunizados intraperitoneal (IP) ou subcutaneamente (SC) com células que expressam CD20 em adjuvante de Freund completo, seguido a cada semana por imunizações IP (até um total de 10) com células que expressam CD20 em PBS. A resposta imune pode ser monitorada durante o curso do protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas pelas sangrias retroorbitais. O plasma pode ser triado pela análise FACS (como descrito abaixo) e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-CD20 podem ser usados para fusões. Os
- 10 camundongos podem ser reforçados intravenosamente com células que expressam CD20 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço.

Geração de Hibridomas Que Produzem Anticorpos Monoclonais humanos para CD20

- 20 Para gerar hibridomas que produzem anticorpos monoclonais humanos para as CD20 humanas, as células de esplenócitos e linfônodos de camundongos imunizados podem ser isoladas e fundidas a uma linhagem de célula imortalizada apropriada, tal como uma linhagem de célula de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser depois triados quanto a produção de anticorpos antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões de
- 25 célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundidas a células de mieloma de camundongo não secretor SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com 50 % de PEG (p/v). As células podem ser plaqueadas em aproximadamente 1×10^5 por reservatório em placa microtituladora de fundo chato, seguido por uma incubação de duas semanas

em meio seletivo contendo além de reagentes usuais 10 % de Soro de Clone fetal, 5 a 10 % de fator de clonagem de hibridoma *origen* (IGEN) e 1X HAT (Sigma). Depois de aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio em que o HAT é substituído com HT. Os reservatórios individuais podem ser depois triados pelo ELISA quanto aos anticorpos contendo a cadeia leve capa humana e pela análise FACS usando células que expressam CD20 quanto a especificidade de CD20. Uma vez que o crescimento de hibridoma extensivo ocorre, o meio pode ser observado usualmente depois de 10 a 14 dias. Os hibridomas que secretam anticorpo podem ser replaqueados, novamente triados e se ainda positivos quanto aos anticorpos monoclonais de IgG, anti-CD20 humanos podem ser subclonados pelo menos duas vezes pela diluição limitadora. Os subclones estáveis podem ser depois cultivados *in vitro* para gerar anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

15 Geração de Transfectomas Que Produzem Anticorpos Monoclonais Humanos para CD20

Os anticorpos humanos da invenção também podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de gene como é bem conhecido na técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por exemplo, em uma forma de realização, o(s) gene(s) de interesse, por exemplo, genes de anticorpo humano, pode(m) ser ligado(s) em um vetor de expressão tal como um plasmídeo de expressão eucariótico tal como usado pelo sistema de expressão de gene GS divulgado na WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338 841 ou outros sistemas de expressão bem conhecidos na técnica. O plasmídeo purificado com os genes de anticorpo clonados podem ser introduzidos em células hospedeiras eucarióticas tais como células CHO, células NS/0 ou células HEK293 ou alternativamente

outras células eucarióticas como uma célula derivada de planta, fungos ou células de levedura. O método usado para introduzir estes genes pode ser um dos métodos descritos na técnica tais como eletroporação, lipofectina, lipofectamina ou outros. Depois de introduzir estes genes de anticorpo nas

5 células hospedeiras, as células que expressam o anticorpo podem ser identificadas e selecionadas. Estas células representam os transfectomas que podem ser depois amplificados quanto ao seu nível de expressão e *upscaled* para produzir anticorpos. Os anticorpos recombinantes podem ser isolados e purificados a partir destes sobrenadantes de cultura e/ou células.

10 Outros Meios Recombinantes para Produzir Anticorpos Monoclonais Humanos para CD20

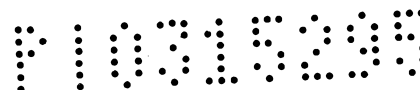
Alternativamente, os genes de anticorpo clonados podem ser expressados em outros sistemas de expressão, incluindo células procarióticas, tais como microorganismos, tais como *E. coli*, para a produção de anticorpos

15 Fv de cadeia única, algas, assim como células de inseto. Além disso, os anticorpos podem ser produzidos em animais não humanos transgênicos, tais como no leite de ovelhas e coelhos ou nos ovos de galinhas ou em plantas transgênicas. Ver por exemplo Verma, R., *et al.* (1998). Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian

20 expression systems. *J. Immunol. Meth.* 216: 165 a 181; Pollock, *et al.* (1999). Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Meth.* 231: 147 a 157; e Fischer, R., *et al.* (1999). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol. Chem.* 380: 825 a 839.

25 Uso de Seqüências de Anticorpo Parciais para Expressar Anticorpos Inteiros

Os anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácido que estão localizados nas seis regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada e leve. Por esta razão, as seqüências de aminoácido dentro das CDRs

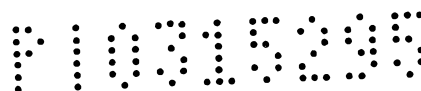


são mais diversas entre anticorpos individuais do que nas seqüências fora das CDRs. Por que as seqüências de CDR são responsáveis pela maioria das interações de anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitem as propriedades de anticorpos que ocorrem naturalmente específicos pela construção de vetores de expressão que incluem seqüências de CDR do anticorpo que ocorre naturalmente específico enxertado em seqüências de esqueleto de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (ver, por exemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332: 323 a 327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321: 522 a 525; e Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029 a 10033). Tais seqüências de esqueleto podem ser obtidas a partir de bases de dados de DNA públicas que incluam as seqüências de gene de anticorpo da linha germinativa. Estas seqüências da linha germinativa irão diferir das seqüências de gene de anticorpo maduras porque elas não incluirão genes variáveis completamente montados, que são formados pela junção V(D)J durante a maturação de célula B. As seqüências de gene da linha germinativa também irão diferir das seqüências de um anticorpo de repertório secundário de alta afinidade na uniformidade individual através da região variável. Por exemplo, as mutações somáticas são relativamente infreqüentes na porção de terminal amino da região de esqueleto 1 e na porção de terminal carbóxi da região de esqueleto 4. Além disso, muitas mutações somáticas não alteram significativamente as propriedades de ligação do anticorpo. Por esta razão, não é necessário obter a seqüência de DNA inteira de um anticorpo particular de modo a recriar um anticorpo recombinante inteiro tendo propriedades de ligação similares àquelas do anticorpo original (ver a WO 99/45962). A seqüência de cadeia pesada e leve parcial que transpõe as regiões de CDR é tipicamente suficiente para este propósito. A seqüência parcial é usada para determinar que a linha germinativa variável e os segmentos de gene de união contribuíram para os genes variáveis de anticorpo recombinado. A seqüência de linha germinativa

é depois usada para preencher nas porções perdidas das regiões variáveis. As seqüências líder de cadeia leve e pesada são clivadas durante a maturação da proteína e não contribuem para as propriedades do anticorpo final. Para adicionar as seqüências perdidas, as seqüências de cDNA clonadas podem ser combinadas com oligonucleotídeos sintéticos pela ligação ou amplificação por PCR. Alternativamente, a região variável inteira pode ser sintetizada como um conjunto de oligonucleotídeos curtos, que se sobrepõem e combinados pela amplificação por PCR para criar um clone de região variável totalmente sintético. Este processo tem certas vantagens tais como a eliminação ou inclusão ou sítios de restrição particulares ou otimização de códon particulares.

As seqüências de nucleotídeo de transcritos de cadeia pesada e leve de hibridomas são usados para planejar um conjunto de sobreposição de oligonucleotídeos sintéticos para criar seqüências V sintéticas com capacidades codificadoras de aminoácido idênticas como as seqüências naturais. As seqüências de cadeia pesada e capa sintéticas podem diferir das seqüências naturais em três modos: filamentos de bases de nucleotídeo repetidas são interrompidas para facilitar a síntese de oligonucleotídeo e a amplificação pela PCR; os sítios de início de tradução ótimos são incorporados de acordo com as regras de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867 a 19870); e sítios HindIII são engendrados a montante dos sítios de início de tradução.

Tanto para a região variável de cadeia pesada quanto leve, as seqüências de filamento codificador otimizado e não codificador correspondentes são quebradas em 30 a 50 nucleotídeos aproximadamente no ponto central do oligonucleotídeo não codificador correspondente. Assim, para cada cadeia, os oligonucleotídeos podem ser montados em conjuntos de filamento duplo sobrepostos que transpõem segmentos de 150 a 400 nucleotídeos. Os agrupamentos são depois usados como padrões para produzir



produtos de amplificação por PCR de 150 a 400 nucleotídeos. Tipicamente, um único conjunto de oligonucleotídeo de região variável será rompido em dois agrupamentos que são separadamente amplificados para gerar dois produtos de PCR sobrepostos. Estes produtos sobrepostos são depois combinados pela amplificação por PCR para formar a região variável completa. Também pode ser desejável incluir um fragmento sobreposto da região constante de cadeia pesada ou leve (incluindo o sítio BbsI da cadeia leve capa ou o sítio AgeI se a cadeia pesada gama) na amplificação pela PCR para gerar fragmentos que possam ser facilmente clonados nas construções de vetor de expressão.

As regiões variáveis de cadeia pesada e leve reconstruídas são depois combinadas com promotores clonados, sequência líder, início de tradução, região constante, 3' não traduzida, terminação de poliadenilação e transcrição, sequências para formar construções de vetor de expressão. As construções de expressão de cadeia pesada e leve podem ser combinadas em um único vetor, co-transfectadas, transfectadas em série ou transfectadas separadamente em células hospedeiras que são depois fundidas para formar uma célula hospedeira que expresse ambas as cadeias.

Os plasmídeos para o uso na construção de vetores de expressão para a IgGκ humana são descritas abaixo. Os plasmídeos foram construídos de modo que as sequências de cDNA de cadeia pesada V e leve capa V amplificadas pela PCR pudessem ser usadas para a reconstrução dos minigenes de cadeia pesada e leve completos. Estes plasmídeos podem ser usados para expressar completamente os anticorpos IgG1,κ ou IgG4,κ humanos ou quiméricos. Os plasmídeos similares podem ser construídos para a expressão de outros isótipos de cadeia pesada ou para a expressão de anticorpos que compreendem cadeia leves lambda.

Assim, em um outro aspecto da invenção, as características estruturais dos anticorpos anti-CD20 humanos da invenção, por exemplo,

11B8, 2F2 ou 7D8, são usados para criar anticorpos anti-CD20 humanos estruturalmente relacionados que retenham pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tais como a ligação à CD20. Mais especificamente, uma ou mais regiões CDR de 2F2, 7D8 ou 11B8 podem ser

5 combinadas recombinantemente com regiões de esqueleto e CDRs humanas conhecidas para criar anticorpos anti-CD20 humanos da invenção adicionais, recombinantemente engendrados.

Conseqüentemente, em uma outra forma de realização, a invenção fornece um método para preparar um anticorpo anti-CD20 que

10 compreende:

preparar um anticorpo que compreende (1) as regiões de esqueleto de cadeia pesada humana e CDRs de cadeia pesada humana, em que pelo menos uma das CDRs de cadeia pesada humana compreende uma seqüência de aminoácido selecionada das seqüências de aminoácido das

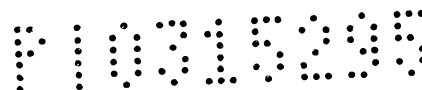
15 CDRs mostradas nas Figuras 53, 55 ou 57 (ou resíduos de aminoácido correspondentes nas SEQ ID NOs: 13 a 15, 19 a 21 ou 25 a 27); e (2) regiões de esqueleto de cadeia leve humana e CDRs de cadeia leve humana, em que pelo menos uma das CDRs de cadeia leve humana compreende uma seqüência de aminoácido selecionada das seqüências de aminoácido das

20 CDRs mostradas nas Figuras 53, 55 ou 57 (ou resíduos de aminoácido correspondentes nas SEQ ID NOs: 16 a 18, 22 a 24 ou 28 a 30); em que o anticorpo retém a capacidade para se ligar à CD20.

A capacidade do anticorpo para se ligar à CD20 pode ser determinada usando-se ensaios de ligação padrão, tais como aqueles

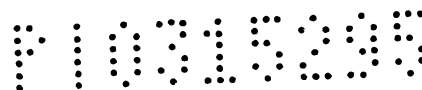
25 apresentados nos Exemplos (por exemplo, uma análise FACS).

Visto que é bem conhecido na técnica que os domínios de CDR3 de cadeia pesada e leve de anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade de ligação/afinidade de um anticorpo para um antígeno, os anticorpos recombinantes da invenção



preparados como apresentado acima preferivelmente compreendem as CDR3s de cadeia pesada e leve de 2F2, 7D8 ou 11B8. Os anticorpos podem ainda compreender as CDR2s de 2F2, 7D8 ou 11B8. Os anticorpos podem ainda compreender as CDR1s de 2F2, 7D8 ou 11B8. Conseqüentemente, a invenção ainda fornece anticorpos anti-CD20 que compreendem: (1) as regiões de esqueleto de cadeia pesada humana, uma região CDR1 de cadeia pesada humana, região CDR2 de cadeia pesada humana e região CDR3 de cadeia pesada humana, em que a região CDR3 de cadeia pesada humana é a CDR3 de 2F2, 7D8 ou 11B8 como mostradas nas figuras 53, 55 ou 57 (ou resíduo de aminoácidos correspondentes como mostrados na SEQ ID NOS: 15, 21 ou 27); e (2) regiões de esqueleto de cadeia leve humana, uma região CDR1 de cadeia leve humana, uma região CDR2 de cadeia leve humana e uma região CDR3 de cadeia leve humana, em que a região CDR3 de cadeia leve humana é a CDR3 de 2F2, 7D8 ou 11B8 como mostradas nas figuras 53, 55 ou 57 (ou resíduos de aminoácido correspondentes como mostrados nas SEQ ID NOS: 18, 24 ou 30), em que o anticorpo se liga à CD20. O anticorpo pode ainda compreender a CDR2 de cadeia pesada e/ou a CDR2 de cadeia leve de 2F2, 7D8 ou 11B8. O anticorpo pode ainda compreender a CDR1 de cadeia pesada e/ou a CDR1 de cadeia leve de 2F2, 7D8 ou 11B8.

Preferivelmente, a CDR1, 2, e/ou 3 dos anticorpos engendrados descritos acima compreendem a(s) seqüência(s) de aminoácido exata(s) como aquela(s) de 2F2, 7D8 ou 11B8 divulgada(s) aqui. Entretanto, o técnico ordinariamente habilitado avaliará que algum desvio das seqüências de CDR exatas de 2F2, 7D8 ou 11B8 pode ser possível embora ainda retenha a capacidade do anticorpo para ligar-se à CD20 eficazmente (por exemplo, substituições conservativas). Conseqüentemente, em uma outra forma de realização, o anticorpo engendrado pode ser composto de uma ou mais CDRs que são, por exemplo, 90 %, 95 %, 98 % ou 99,5 % idênticas a uma ou mais CDRs de 2F2, 7D8 ou 11B8.



Além de simplesmente ligar CD20, os anticorpos engendrados tais como aqueles descritos acima podem ser selecionados quanto a sua retenção de outras propriedades funcionais de anticorpos da invenção, tais como:

- 5 (1) baixa taxa de dissociação de CD20;
- (2) ligação de alto afinidade à CD20;
- (3) ligação a um epítipo único na CD20, e/ou ligação em uma orientação específica à CD20, e/ou ligação a uma forma específica de CD20;
- (4) mediação de um nível alto de CDC nas células CD55/59
- 10 negativas ou CD55/59 positivas;
- (5) translocação em balsas lipídicas na ligação à CD20;
- (6) inibição do crescimento de células que expressam CD20;
- (7) indução da apoptose de células que expressam CD20;
- (8) indução da adesão homotípica de células que expressam
- 15 CD20;
- (9) sobrevivência prolongada de um paciente que tenha células de tumor que expressem CD20;
- (10) mediação de ADCC de alvos de CD20 quando misturados com células efetoras apropriadas;
- 20 (11) capacidade para esgotar células que expressam CD20; e/ou
- (12) capacidade para esgotar células que expressam níveis baixos de CD20 (células CD20^{baixo}).

25 Caracterização da Ligação de Anticorpos Monoclonais Humanos à CD20

Para purificar anticorpos anti-CD20 humanos, hibridomas selecionados podem ser cultivados em frascos giratórios de dois litros para a purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sepharose

(para anticorpos de isótipo IgG1) (Pharmacia, Piscataway, NJ) ou sepharose revestida com IgG anti-humana ou proteína G-sepharose no caso de anticorpos de isótipo IgG3. A IgG eluída pode ser checada pela eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir pureza. A
5 solução tampão pode ser mudada em PBS e a concentração pode ser determinada pela OD₂₈₀ usando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-CD20 humanos selecionados se ligam aos epítomos únicos, as mutagêneses
10 direcionada ao sítio ou direcionada ao sítio múltiplo podem ser usadas.

Para determinar o isótipo de anticorpos purificados, ELISAs de isótipo podem ser realizados. Os reservatórios de placas de microtítulo podem ser revestidos com 10 µg/ml de Ig anti-humano durante a noite a 4°C. Depois de bloquear com 5 % de BSA, as placas são reagidas com 10 µg/ml de
15 anticorpos monoclonais ou controles de isótipo purificados, na temperatura ambiente durante duas horas. Os reservatórios podem ser depois reagidos com IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanas ou sondas conjugadas com alcalino fosfatase IgM-específica humanas. Depois de lavar, as placas são desenvolvidas com substrato pNPP (1 mg/ml) e analisadas na OD de 405 a
20 650.

De modo a demonstrar a presença de anticorpos anti-CD20 nos soros de camundongos imunizados ou ligação de anticorpos monoclonais nas células vivas que expressam a CD20, a citometria de fluxo pode ser usada. Em resumo, a linhagens de célula que expressam CD20 (cultivadas sob
25 condições de crescimento padrão) são misturadas com várias concentrações de anticorpos monoclonais em PBS contendo 0,1 % de BSA e 0,02 % de azida de sódio e incubadas a 4°C durante 30 min. Depois de lavar, as células são reagidas com anticorpo IgG anti-humano rotulado com fluoresceína sob as mesmas condições como o tingimento do anticorpo primário. As amostras



podem ser analisadas pela citometria de fluxo com um instrumento FACS usando as propriedades óticas e de dispersão lateral para obter células únicas, vivas. Um ensaio alternativo usando a microscopia de fluorescência pode ser usado (além ou ao invés do) ensaio de citometria de fluxo. As células podem ser tingidas exatamente como descrito acima e examinadas pela microscopia de fluorescência. Este método permite a visualização de células individuais, mas pode ter a sensibilidade diminuída dependendo da densidade do antígeno.

As IgGs anti-CD20 humanas podem ser ainda testadas quanto a reatividade com antígeno de CD20 pelo Western blotting. Em resumo, os extratos de células que expressam CD20 podem ser preparados e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS). Depois da eletroforese, os antígenos separados serão transferidos às membranas de nitrocelulose, bloqueados com 20 % de soro de camundongo e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação de IgG humana pode ser detectada usando alcalino fosfatase de IgG anti-humana e desenvolvida com tabletes de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Atividades Fagocíticas e de matança de Célula de Anticorpos Monoclonais Humanos para CD20

Além da ligação especificamente à CD20, os anticorpos monoclonais anti-CD20 humanos podem ser testados quanto a sua capacidade para mediar a fagocitose e a morte de células que expressam CD20. O teste de atividade monoclonal de anticorpo *in vitro* fornecerá uma triagem inicial antes de testar modelos *in vivo*. Em resumo, as células polimorfonucleares (PMNs), células NK, monócitos ou outras células efectoras, de doadores saudáveis podem ser purificadas pela centrifugação de densidade Ficoll Hypaque, seguida pela lise de eritrócitos contaminantes. As PMNs lavadas, podem ser colocadas em suspensão em RPMI suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal inativado pelo calor e misturadas com células rotuladas com ^{51}Cr

que expressam CD20, em várias relações de células efetoras para células de tumor (-células efetoras:células de tumor). As IgGs anti-CD20 humanas purificadas podem ser depois adicionadas em várias concentrações. A IgG humana inaplicável pode ser usada como controle negativo. Os ensaios
 5 podem ser realizados durante 4 a 20 horas a 37°C dependendo do tipo de célula efetora usado. As amostras podem ser ensaiadas quanto a citólise medindo-se a liberação de ^{51}Cr no sobrenadante de cultura. Anticorpos monoclonais anti-CD20 também podem ser testados em combinações entre si para determinar se a citólise é realçada com anticorpos monoclonais
 10 múltiplos.

Os anticorpos monoclonais humanos que se ligam à CD20 também podem ser testados em um modelo *in vivo* (por exemplo, em camundongos) para determinar a sua eficácia em controlar o crescimento de células de tumor que expressam CD20. Estes anticorpos podem ser
 15 selecionados, por exemplo, com base nos seguintes critérios, que não são intencionados a serem exclusivos:

1. ligação às células vivas que expressam CD20;
2. baixa taxa de dissociação de CD20;
3. alta afinidade de ligação à CD20;
- 20 4. ligação a um epítipo único na CD20; e/ou ligação em uma orientação específica à CD20, e/ou ligação a uma forma específica de CD20;
5. opsonização de células que expressam CD20;
6. mediação da inibição do crescimento, fagocitose e/ou a morte de células que expressam CD20 na presença de células efetoras
 25 humanas;
7. capacidade para induzir CDC em células CD55/CD59 negativas ou positivas;
8. capacidade para induzir a adesão homotípica;
9. capacidade para induzir a translocação em balsas lipídicas

na ligação à CD20;

10. capacidade para induzir a apoptose;

11. capacidade para induzir ADCC em células que expressam CD20;

5 12. capacidade para esgotar células que expressam CD20; e/ou

13. capacidade para esgotar células que expressam níveis baixos de CD20 (células CD20^{baixo}).

Os anticorpos monoclonais humanos preferidos da invenção atingem um ou mais destes critérios.

10 Os anticorpos monoclonais anti-CD20 humanos podem ser testados quanto a sua capacidade para mediar CDC usando uma variedade de técnicas conhecidas. Por exemplo, o soro para complemento pode ser obtido a partir do sangue de pacientes saudáveis que pode ser centrifugado e colhido. Para determinar a atividade de CDC de vários mAbs, métodos diferentes

15 podem ser usados. A liberação de ⁵¹Cr por exemplo pode ser medida ou a permeabilidade de membrana elevada podem ser avaliada usando um ensaio de exclusão de iodeto de propídio (PI). Em resumo, as células alvo podem ser lavadas e recolocadas em suspensão em RPMI-1 % de BSA a 1×10^6 /ml. Várias concentrações de mAb podem ser adicionadas às células e deixadas

20 ligar durante 10 a 15 min na temperatura ambiente. O soro pode ser depois adicionado a uma concentração final de 20 % (v/v) e as células incubadas a 37°C durante 45 min. Todas as células de cada amostra podem ser adicionadas à solução PI em um tubo de FACS. A mistura pode ser depois ensaiada imediatamente pela citometria de fluxo usando um citômetro de

25 fluxo FACScalibur e analisada usando o software CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA).

Para testar quanto a capacidade para iniciar a apoptose, anticorpos monoclonais anti-CD20 humanos, por exemplo, podem ser incubados com células de tumor positivas em CD20, por exemplo, Daudi a

37°C durante cerca de 20 horas. As células podem ser colhidas, lavadas em tampão de ligação Annexin-V-FITC (BD biosciences) e rotuladas com Annexin V-FITC (BD biosciences) durante 15 min no escuro a 4°C. Todas as células de cada amostra podem ser adicionadas à solução de PI (10 µg/ml em PBS) em um tubo FACS e imediatamente ensaiadas pela citometria de fluxo (como acima).

Em uma forma de realização particular da invenção, os anticorpos monoclonais humanos são usados em combinação, por exemplo, como uma composição farmacêutica que compreende dois ou mais anticorpos monoclonais anti-CD20. Por exemplo, anticorpos monoclonais anti-CD20 humanos tendo atividades diferentes mas complementares podem ser combinados em uma única terapia para se obter um efeito terapêutico ou de diagnóstico desejado. Em uma forma de realização preferida, a composição inclui um anticorpo anti-CD20 monoclonal humano que medeia CDC combinado com um outro anticorpo monoclonal anti-CD20 humano que induz a apoptose. Em uma outra forma de realização, a composição inclui um anticorpo anti-CD20 monoclonal humano que medeia a morte altamente eficaz de células alvo na presença de células efetoras, combinado com um outro anticorpo monoclonal anti-CD20 humano que inibe o crescimento de células que expressam CD20.

II. Produção de Animais não Humanos Transgênicos Que Geram Anticorpos Monoclonais anti-CD20 Humanos

Já em um outro aspecto, a invenção fornece animais não humanos transgênicos e transcromossômicos, tais como camundongos transgênicos ou transcromossômicos, que são capazes de expressar anticorpos humanos que especificamente se ligam à CD20. Em uma forma de realização particular, a invenção fornece um camundongo transgênico ou transcromossômico tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada humana, tal que o camundongo produza anticorpos anti-CD20



humanos quando imunizados com células que expressam CD20. O transgene de cadeia pesada humana pode ser integrado no DNA cromossômico do camundongo, como é o caso para camundongos transgênicos, por exemplo, HuMAb, como aqui descrito em detalhes e exemplificado. Alternativamente,

5 o transgene de cadeia pesada humana pode ser mantido extracromossomicamente, como é o caso para camundongos transcromossômico (por exemplo, KM) como descrito na WO 02/43478. Tais animais transgênicos e transcromossômicos são capazes de produzir isótipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para CD20 (por exemplo, IgG,

10 IgA e/ou IgE) passando pela recombinação V-D-J/V-J e mudança de isótipo. O planejamento de um animal transgênico ou transcromossômico não humano que responde ao estímulo de antígeno estranho com um repertório de anticorpo heterólogo, requer que os transgenes de imunoglobulina heterólogos contidos dentro do animal transgênico funcionem corretamente por todo o

15 caminho do desenvolvimento da célula B. Isto inclui, por exemplo, a mudança de isótipo do transgene de cadeia pesada heterólogo. Conseqüentemente, os transgenes são construídos de modo que a mudança de isótipo possa ser induzida e uma ou mais das seguintes características de genes de anticorpo:

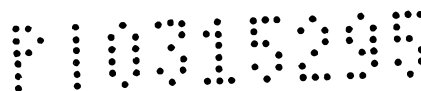
20 (1) expressão de nível alto e específica do tipo de célula, (2) rearranjo do gene funcional, (3) ativação e resposta à exclusão alélica, (4) expressão de um repertório primário suficiente, (5) transdução de sinal, (6) hipermutação somática e (7) domínio do local de anticorpo de transgene durante a resposta imune.

Nem todos os critérios precedentes precisam ser atingidos. Por

25 exemplo, naquelas formas de realização em que os locais de imunoglobulina endógena do animal transgênico são funcionalmente rompidos, o transgene não precisa ativar a exclusão alélica. Além disso, naquelas formas de realização em que o transgene compreende um gene da imunoglobulina de cadeia pesada e/ou leve funcionalmente rearranjado, o segundo critério de

rearranjo do gene funcional é desnecessário, pelo menos para aquele transgene que já é rearranjado. Quanto aos fundamentos sobre imunologia molecular, ver, Fundamental Immunology, 2ª edição (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

- 5 Em certas formas de realização, os animais transgênicos ou transcromossômicos não humanos usados para gerar os anticorpos monoclonais humanos da invenção contêm rearranjados, não rearranjados ou uma combinação de transgenes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina heterólogos rearranjados e não rearranjados na linha germinativa do animal
- 10 transgênico. Cada um dos transgenes de cadeia pesada compreende pelo menos um gene C_H . Além disso, o transgene de cadeia pesada pode conter seqüências de mudança de isótipo funcionais, que são capazes de sustentar a mudança de isótipo de um transgene heterólogo que codifica genes C_H múltiplos nas células B do animal transgênico. Tais seqüências de mudança
- 15 podem ser aquelas que ocorrem naturalmente no local da imunoglobulina da linha germinativa das espécies que servem como a fonte dos genes C_H de transgene ou tais seqüências de mudança podem ser derivadas daquelas que ocorrem nas espécies que devam receber a construção de transgene (o animal transgênico). Por exemplo, uma construção de transgene humana que é usada
- 20 para produzir um camundongo transgênico pode produzir uma freqüência mais alta de eventos de mudança de isótipo se ela incorpora seqüências de mudança similares àquelas que ocorrem naturalmente no local de cadeia pesada de camundongo, visto que presumivelmente as seqüências de mudança de camundongo são otimizadas para funcionar com o sistema de enzima de
- 25 recombinase de mudança de camundongo, ao passo que as seqüências de mudança humanas não o são. As seqüências de mudança podem ser isoladas e clonadas pelos métodos de clonagem convencionais ou podem ser sintetizadas de novo a partir de oligonucleotídeos sintéticos sobrepostos planejados com base na informação de seqüência publicada com respeito às seqüências da



região de mudança da imunoglobulina (Mills *et al.*, Nucl. Acids Res. 15: 7305 a 7316 (1991); Sideras *et al.*, Intl. Immunol. 1: 631 a 642 (1989)). Para cada um dos animais transgênicos estranhos, os transgenes de imunoglobulina de cadeia pesada e leve heterólogos funcionalmente rearranjados são encontrados em uma fração significativa das células B do animal transgênico (pelo menos 10 por cento).

Os transgenes usados para gerar os animais não humanos transgênicos da invenção incluem um transgene de cadeia pesada que compreende DNA que codifica pelo menos um segmento de gene variável, um segmento de gene de diversidade, um segmento de gene de junção e pelo menos um segmento de gene de região constante. O transgene de cadeia leve de imunoglobulina compreende DNA que codifica pelo menos um segmento de gene variável, um segmento de gene de junção e pelo menos um segmento de gene de região constante. Os segmentos de gene que codificam os segmentos de gene de cadeia leve e pesada são heterólogos ao animal transgênico a partir dos quais eles são derivados ou correspondem ao DNA que codifica os segmentos de gene de cadeia pesada e leve da imunoglobulina de uma espécie que não consiste do animal não humano transgênico. Em um aspecto da invenção, o transgene é construído tal que os segmentos de gene individuais não são rearranjados, isto é, não rearranjados de modo a codificar uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina funcional. Tais transgenes não rearranjados sustentam a recombinação dos segmentos de gene V, D e J (rearranjo funcional) e preferivelmente sustentam a incorporação de todo ou uma porção de um segmento de gene da região D na cadeia pesada de imunoglobulina rearranjada resultante dentro do animal transgênico quando exposto ao antígeno de CD20.

Em uma forma de realização alternativa, os transgenes compreendem um “mini-local” não rearranjado. Tais transgenes tipicamente compreendem uma porção substancial dos segmentos C, D e J assim como

um subconjunto dos segmentos de gene V. Em tais construções de transgene, as várias seqüências reguladoras, por exemplo promotores, realçadores, regiões de mudança de classe, seqüências doadoras de junção e aceitadoras de junção para o processamento de RNA, sinais de recombinação e outros, compreendem as seqüências correspondentes derivadas do DNA heterólogo. Tais seqüências reguladoras podem ser incorporadas no transgene da mesma ou de uma espécie relacionada do animal não humano usado na invenção. Por exemplo, os segmentos de gene da imunoglobulina humana podem ser combinados em um transgene com uma seqüência realçadora de imunoglobulina de roedor para o uso em um camundongo transgênico. Alternativamente, as seqüências reguladoras sintéticas podem ser incorporadas no transgene, em que tais seqüências reguladoras sintéticas não são homólogas a uma seqüência de DNA funcional que é conhecida ocorrer naturalmente nos genomas de mamíferos. As seqüências reguladoras sintéticas são planejadas de acordo com as regras de consenso, tais como, por exemplo, aquelas que especificam as seqüências permissíveis de um sítio aceitador de junção ou um motivo de promotor/realçador. Por exemplo, um minilocal compreende uma porção do local da imunoglobulina genômica tendo pelo menos uma supressão interna (isto é, não em um término da porção) de uma porção de DNA não essencial (por exemplo, seqüência interventora; intron ou porção deste) quando comparado com a linha germinativa Ig local que ocorre naturalmente.

Os animais transgênicos e transcromossômicos não humanos preferidos, por exemplo, camundongos, exibem produção de imunoglobulina com um repertório significativo, ideal e substancialmente similar àquele de um ser humano depois de ajustar quanto ao volume.

O repertório idealmente aproximar-se-á daquele mostrado em um ser humano quando ajustado quanto ao volume, usualmente com uma diversidade de pelo menos cerca de 10 % maior, preferivelmente 25 a 50 %

ou mais. No geral, pelo menos cerca de mil imunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferivelmente de 10^4 a 10^6 ou mais, serão produzidas, dependendo do número de regiões V, J e D diferentes introduzidas no genoma de camundongo e direcionadas pela diversidade adicional gerada pelas

5 adições de nucleotídeo aleatórias em rearranjos de segmento de gene V(-D-)J nas regiões de junção. Tipicamente, as imunoglobulinas exibirão uma afinidade (K_D) para antígenos pré selecionados abaixo de 10^{-7} M, tais como abaixo de 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda mais baixo.

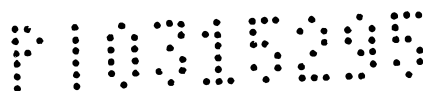
Os animais não humanos transgênicos e transcromossômicos,

10 por exemplo, camundongos, como descritos acima podem ser imunizados, por exemplo, com células que expressam CD20. Alternativamente, os animais transgênicos podem ser imunizados com DNA que codifica CD20 humana. Os animais produzirão depois células B que passam pela mudança de classe por intermédio da recombinação de mudança (cis-mudança) e expressam

15 imunoglobulinas reativas com CD20. As imunoglobulinas podem ser anticorpos humanos (também aludidos como “anticorpos de seqüência humana”), em que os polipeptídeos de cadeia pesada e leve são codificados pelas seqüências de transgene humano, que podem incluir seqüências derivadas pela mutação somática e juntas recombinatoriais da região V, assim

20 como seqüências codificadas pela linha germinativa; Estes anticorpos humanos podem ser aludidos como sendo substancialmente idênticos a uma seqüência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene V_L e J_L ou V_H , D_H e J_H humanos, embora outras seqüências que não da linha germinativa possam estar presentes como um resultado da mutação somática e juntas de

25 recombinação V-J e V-D-J diferenciais. As regiões variáveis de cada cadeia de anticorpo são tipicamente pelo menos 80 por cento similares à linha germinativa V, J humana e, no caso de cadeias pesadas, segmentos de gene D; freqüentemente pelo menos 85 por cento similares às seqüências de linha germinativa humanas presentes no transgene; freqüentemente 90 ou 95 por



cento ou mais similares às seqüências de linha germinativa humana presentes no transgene. Entretanto, visto que seqüências que não da linha germinativa são introduzidas pela mutação somática e junção VJ e VDJ, os anticorpos de seqüência humana freqüentemente terão algumas seqüências de região variável que não são codificadas pelos segmentos de gene V, D ou J humanos como encontrado no(s) transgene(s) humano(s) na linha germinativa dos camundongos. Tipicamente, tais seqüências de linha germinativa (ou posições de nucleotídeo individuais) formarão cachos nas ou próximo das CDRs ou nas regiões onde as mutações somáticas são conhecidas por formar cachos.

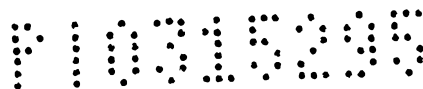
10 Um outro aspecto da invenção inclui células B derivadas de animais transgênicos ou transcromossômicos não humanos como descrito aqui. As células B podem ser usadas para gerar hibridomas que expressam anticorpos monoclonais humanos que se ligam com alta afinidade (por exemplo, uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) mais baixa do que 15 10^{-7} M) para as CD20 humanas. Assim, em uma outra forma de realização, a invenção fornece um hibridoma que produza um anticorpo humano tendo uma afinidade (K_D) abaixo de 10^{-7} M, tal como abaixo de 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda mais baixa quando determinada pela análise *scatchard* de células que expressam CD20 usando um anticorpo monoclonal radioativamente 20 rotulado ou pela determinação da concentração de ligação semi-máxima usando a análise FACS.

Aqui o anticorpo monoclonal compreende uma seqüência de cadeia leve humana composta de (1) uma região variável de cadeia leve tendo uma seqüência de polipeptídeo que seja substancialmente idêntica a uma 25 seqüência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene V_L humano e um segmento J_L humano e (2) uma região constante de cadeia leve codificada por um segmento de gene C_L humano; e

uma seqüência de cadeia pesada humana composta de (1) uma região variável de cadeia pesada tendo uma seqüência de polipeptídeo que

seja substancialmente idêntica a uma seqüência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene V_H humano, uma região D e um segmento J_H humano e (2) uma região constante codificada por um segmento de gene C_H humano.

- 5 O desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos contra CD20 de alta afinidade pode ser facilitado por um método para expandir o repertório de segmentos de gene da região variável humana em um animal não humano transgênico tendo um genoma que compreende um transgene de imunoglobulina humana integrado, o dito método
- 10 compreendendo introduzir no genoma um transgene de gene V que compreende segmentos de gene da região V que não estão presentes no dito transgene de imunoglobulina humana integrado. Frequentemente, o transgene da região V é um cromossoma artificial de levedura que compreende uma porção de uma série de segmento de gene V_H ou V_L (V_K) humano, como pode
- 15 naturalmente ocorrer em um genoma humano ou como pode ser unido separadamente pelos métodos recombinantes, que podem incluir segmentos de gene V fora de ordem ou omitidos. Frequentemente pelo menos cinco ou mais segmentos de gene V funcionais estão contidos no YAC. Nesta variação, é possível tornar um animal transgênico produzido pelo método de expansão
- 20 do repertório V, em que o animal expressa uma cadeia de imunoglobulina que compreende uma seqüência de região variável codificada por um segmento de gene da região V presente no transgene da região V e uma região C codificada no transgene Ig humano. por meio do método de expansão de repertório V, animais transgênicos tendo pelo menos 5 genes V distintos podem ser
- 25 gerados; como o pode animais contendo pelo menos cerca de 24 genes V ou mais. Alguns segmentos de gene V podem não ser funcionais (por exemplo, pseudogenes e outros); estes segmentos podem ser retidos ou podem ser seletivamente suprimidos pelos métodos recombinantes disponíveis ao técnico habilitado, se desejado.



Uma vez a linha germinativa de camundongo tenha sido engendrada para conter um YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido, substancialmente não presente no transgene Ig humano contendo os segmentos de gene J e C, o trato pode ser propagado e cruzado em outros fundos genéticos, incluindo fundos onde o YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido é cruzado em uma linha germinativa de animal não humano tendo um transgene Ig humano diferente. Os YACs funcionais múltiplos tendo um repertório de segmento V expandido pode ser cruzado em uma linha germinativa para funcionar com um transgene de Ig humana (ou transgenes de Ig humana múltiplos). Embora aqui aludidos como transgenes YAC, tais transgenes quando integrados no genoma podem carecer substancialmente de seqüências de levedura, tais como as seqüências requeridas para a replicação autônoma em levedura; tais seqüências podem ser opcionalmente removidas pela engenharia genética (por exemplo, digestão de restrição e eletroforese em gel de campo pulsado ou outro método adequado) depois a replicação em levedura não é mais necessária (isto é, antes da introdução em uma célula ES de camundongo ou prozigoto de camundongo). Os métodos de propagar o trato da expressão da seqüência de imunoglobulina humana, incluem cruzar um animal transgênico tendo o(s) transgene(s) de Ig humana e opcionalmente também tendo um YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido. Tanto o segmento de gene V_H quanto V_L podem estar presentes no YAC. o animal transgênico pode ser cruzado em qualquer fundo desejado pelo técnico, incluindo fundos que abrigam outros transgenes humanos, incluindo transgenes de Ig humana e/ou transgenes que codificam outras proteínas de linfócito humano. A invenção também fornece uma seqüência imunoglobulina humana de alta afinidade produzida por um camundongo transgênico tendo um transgene YAC de repertório de região V expandida. Embora o precedente descreva uma forma de realização preferida do animal transgênico da invenção, outras formas de

realização são consideradas as quais foram classificadas em três categorias:

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

5 II. Animais transgênicos contendo um transgene de imunoglobulina de cadeia pesada não rearranjada e cadeia leve não rearranjada; e

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

10 Destas três categorias de animal transgênico, a ordem preferida de preferência é como segue $II > I > III$ onde os genes de cadeia leve endógenos (ou pelo menos o gene K) foram suprimidos pela recombinação homóloga (ou outro método) e $I > II > III$ onde os genes de cadeia leve endógenos não foram suprimidos e devem ser dominados pela exclusão alélica.

15 III. Moléculas Biespecíficas/ Multiespecíficas Que Se Ligam a CD20

Já em uma outra forma de realização da invenção, anticorpos monoclonais humanos para CD20 podem ser derivatizados ou ligados a uma
20 outra molécula funcional, por exemplo, um outro peptídeo ou proteína (por exemplo, um fragmento Fab') para gerar uma molécula biespecífica ou multiespecífica que se liga aos sítios de ligação múltiplos ou epítomos alvos. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, pela ligação química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como um
25 outro anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas e multiespecíficas que compreendem pelo menos uma primeira especificidade de ligação para CD20 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo. Em uma forma de realização particular da



invenção, o segundo epítipo alvo é um receptor Fc, por exemplo, Fc γ RI humano (CD64) ou um receptor Fc α humano (CD89) ou um receptor de célula T, por exemplo, CD3. Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas e multiespecíficas capazes de ligação tanto a Fc γ R, Fc α R ou Fc ϵ R que expressam células efetoras (por exemplo, monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) quanto para alvejar células que expressam CD20. Estas moléculas biespecíficas e multiespecíficas alvejam células que expressam CD20 à célula efetora e, como os anticorpos monoclonais humanos da invenção, deflagram as atividades de célula efetora receptor mediadas pelo Fc, tais como fagocitose de uma célula que expressa CD20, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocina ou geração de ânion de superóxido.

As moléculas biespecífica e multiespecífica da invenção podem ainda incluir uma terceira especificidade de ligação, além de uma especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-CD20. Em uma forma de realização, a terceira especificidade de ligação é uma porção do fator anti-realce (EF), por exemplo, uma molécula que se liga à uma proteína de superfície envolvida na atividade de citotóxica e deste modo aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A “porção do fator anti-realce” pode ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligando que se liga a uma dada molécula, por exemplo, um antígeno ou um receptor e deste modo resulta em um realce do efeito dos determinantes de ligação para o receptor Fc ou antígeno de célula alvo. A “porção do fator anti-realce” pode ligar-se a um receptor Fc ou um antígeno de célula alvo. Alternativamente, a porção do fator anti-realce pode se ligar a uma entidade que é diferente da entidade à qual a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção do fator anti-realce pode ligar-se a uma célula T citotóxica (por exemplo, por intermédio de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulte em uma resposta imune aumentada

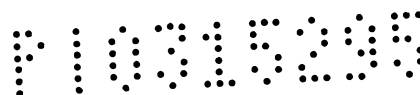
contra a célula alvo).

Em uma forma de realização, as moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ou um Fv de cadeia única. O anticorpo também pode ser um dímero de cadeia leve ou cadeia pesada ou qualquer fragmento mínimo deste tal como um Fv ou uma construção de cadeia única como descrito em Ladner *et al.* US 4.946.778. O anticorpo também pode ser um domínio de ligação da proteína de fusão da imunoglobulina como divulgado na US 2003/0118592 e US 2003/0133939.

Em uma forma de realização as moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção compreendem uma especificidade de ligação para um FcγR ou um FcαR presente na superfície de uma célula efetora e uma segunda especificidade de ligação para um antígeno de célula alvo, por exemplo, CD20.

Em uma forma de realização, a especificidade de ligação para um receptor Fc é fornecida por um anticorpo monoclonal humano, a ligação do qual não é bloqueada pela imunoglobulina G humana (IgG). Como aqui usado, o termo "receptor de IgG" refere-se a qualquer uma dos oito genes de cadeia γ localizados no cromossoma 1. Estes genes codificam um total de doze isoformas de transmembrana ou receptor solúvel que são agrupados em três classes de receptor Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16). Em uma forma de realização preferida, o receptor de Fcγ é um FcγRI humano de alta afinidade.

A produção e caracterização destes anticorpos monoclonais preferidos são descritas por Fanger *et al.* na WO 88/00052 e na US 4.954.617. Estes anticorpos se ligam a um epítipo de FcγRI, FcγRII ou FcγRIII em um sítio que é distinto do sítio de ligação Fcγ do receptor e, assim, a sua ligação não é bloqueada substancialmente pelos níveis fisiológicos de IgG. Os



anticorpos anti-Fc γ RI específicos úteis nesta invenção são mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. Em outras formas de realização, o anticorpo receptor anti-Fc γ é uma forma humanizada de anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 são descritas em

5 Graziano, R. F. *et al.* (1995) J. Immunol 155 (10): 4996 a 5002 e WO 94/10332. A linhagem de célula que produz o anticorpo H22 foi depositada na American Type Culture Collection em 4 de novembro de 1992 sob a designação HA022CL1 e tem o Acesso N^o CRL 11177.

Ainda em outras formas de realização preferidas, a

10 especificidade de ligação para um receptor Fc é fornecida por um anticorpo que se liga a um receptor de IgA humano, por exemplo, um receptor Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), a ligação do qual é preferivelmente não bloqueada pela imunoglobulina A humana (IgA). O termo “receptor de IgA” é intencionado a incluir o produto de gene de um gene α (Fc α RI) localizado no cromossoma

15 19. Este gene é conhecido por codificar diversas isoformas de transmembrana alternativamente unidas de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) é constitutivamente expressado em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, mas não em populações que não de célula efetora. Fc α RI tem afinidade média tanto para IgA1 quanto IgA2, que é aumentada na exposição

20 às citocinas tais como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H. C. *et al.* (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423 a 440). Quatro anticorpos monoclonais específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 e A77, que se ligam a Fc α RI fora do domínio de ligação do ligando de IgA, foram descritos (Monteiro, R. C. *et al.* (1992) J. Immunol. 148: 1764).

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

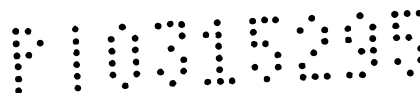
fagocitose); (4) medeiam a apresentação de antígeno realçada de antígenos, incluindo auto-antígenos, alvejados a eles.

Em uma outra forma de realização a molécula biespecífica é compreendida pelos dois anticorpos monoclonais humanos de acordo com a invenção que têm atividades funcionais complementares, tais como um anticorpo que predominantemente funciona pela indução de CDC e o outro anticorpo que predominantemente funciona pela indução da apoptose, por exemplo, 2F2 em combinação com 11B8.

Em outras formas de realização, as moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção ainda compreendem uma especificidade de ligação que reconhece, por exemplo, se liga a, um antígeno de célula alvo, por exemplo, CD20. Em uma forma de realização preferida, a especificidade de ligação é fornecida por um anticorpo monoclonal humano da presente invenção.

Um “anticorpo específico de célula efetora” como aqui usado refere-se a um anticorpo ou fragmento de anticorpo funcional que se liga ao receptor Fc de células efetoras. Os anticorpos preferidos para o uso na invenção objeto se liga ao receptor Fc de células efetoras em um sítio que não é ligado pela imunoglobulina endógena.

Como aqui usado, o termo “célula efetora” refere-se a uma célula imune que está envolvida na fase efetora de uma resposta imune, como oposto às fases cognitivas e de ativação de uma resposta imune. As células imunes exemplares incluem uma célula de uma origem mielóide ou linfóide, por exemplo, linfócitos (por exemplo, células B e células T incluindo células T citolíticas (CTLs)), células matadoras, células matadoras naturais, macrófagos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulócitos, mastóides e basófilos. Algumas células efetoras expressam receptores Fc específicos e realizam funções imunes específicas. Em formas de realização específicas, uma célula efetora é capaz de induzir citotoxicidade

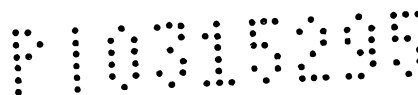


celular dependente de anticorpo (ADCC), por exemplo, um neutrófilo capaz de induzir ADCC. Por exemplo, monócitos, macrófagos, que expressam FcR estão envolvidos na morte específica de células alvo e apresentam antígenos a outros componentes do sistema imune ou ligação às células que apresentam antígenos. Em outras formas de realização, uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo, célula alvo ou microorganismo. A expressão de um FcR particular em uma célula efetora pode ser regulada pelos fatores humorais tais como citocinas. Por exemplo, a expressão de Fc γ RI foi descoberto ser super regulada pelo interferon gama (IFN- γ). Esta expressão realçada aumenta a atividade citotóxica de células que carregam Fc γ RI contra alvos. Uma célula efetora pode fagocitar ou lisar um antígeno alvo ou uma célula alvo.

“Célula alvo” deve significar qualquer célula indesejável em um paciente (por exemplo, um ser humano ou animal) que pode ser alvejada por uma composição (por exemplo, um anticorpo monoclonal humano, uma molécula biespecífica ou uma multiespecífica) da invenção. Em formas de realização específicas, a célula alvo é uma célula que expressa ou que super expressa CD20. As células que expressam CD20 tipicamente incluem células B e tumores de célula B.

Embora os anticorpos monoclonais humanos sejam preferidos, outros anticorpos que podem ser utilizados nas moléculas biespecífica ou multiespecífica da invenção são anticorpos monoclonais de murino, quiméricos e humanizados. Tais anticorpos monoclonais de murino, quiméricos e humanizados podem ser preparados pelos métodos conhecidos na técnica.

As moléculas biespecíficas e multiespecíficas da presente invenção podem ser fabricadas usando técnicas químicas (ver por exemplo, D. M. Kranz *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5807), técnicas de “polidoma” (Ver a US 4.474.893, concedida a Reading) ou técnicas de DNA recombinante.



Em particular, as moléculas biespecíficas e multiespecíficas da presente invenção podem ser preparadas conjugando-se as especificidades de ligação constituintes, por exemplo, as especificidades de ligação anti-FcR e anti-CD20, usando métodos conhecidos na técnica e descritos nos exemplos aqui fornecidos. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica e multiespecífica pode ser gerada separadamente e depois conjugadas entre si. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes de ligação ou reticulação podem ser usados para a conjugação covalente. Os exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) e 4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC) (ver por exemplo, Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Outros métodos incluem aqueles descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) Nº 78, 118 a 132); Brennan *et al.* (Science (1985) 229: 81 a 83) e Glennie *et al.* (J. Immunol. (1987) 139: 2367 a 2375). Os agentes de conjugação preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis da Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação são anticorpos, eles podem ser conjugados por intermédio de ligações sulfidríla das regiões de articulação do término C das duas cadeias pesadas. em uma forma de realização particularmente preferida, a região de articulação é modificada para conter um número ímpar de resíduos de sulfidríla, preferivelmente um, antes da conjugação.

Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressados e montados na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente útil onde a molécula biespecífica e

multiespecífica é um mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligando x proteína de fusão de Fab. Uma molécula biespecífica e multiespecífica da invenção, por exemplo, uma molécula biespecífica pode ser uma molécula de cadeia única, tal como um anticorpo biespecífico de cadeia única, uma

5 molécula biespecífica de cadeia única que compreende um anticorpo de cadeia única e um determinante de ligação ou uma molécula biespecífica de cadeia única que compreende dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas e multiespecíficas também podem ser moléculas de cadeia única ou podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Os

10 métodos para preparar moléculas bi- e multiespecíficas são descritos por exemplo na US 5.260.203, US 5.455.030, US 4.881.175, US 5.132.405, US 5.091.513, US 5.476.786, US 5.013.653, US 5.258.498 e US 5.482.858.

A ligação das moléculas biespecíficas e multiespecíficas a seus alvos específicos pode ser confirmada pelo ensaio imunossorvente ligado a

15 enzima (ELISA), um radioimunoensaio (RIA), análise FACS, um bioensaio (por exemplo, inibição de crescimento) ou um Ensaio de Western Blot. Cada um destes ensaios no geral detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de interesse particular pela utilização de um reagente rotulado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por

20 exemplo, os complexos de FcR-anticorpo podem ser detectados usando por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou fragmento de anticorpo que reconhece e especificamente se liga aos complexos anticorpo-FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados usando qualquer um de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser

25 radioativamente rotulado e usado em um radioimunoensaio (RIA) (ver, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Março, 1986). O isótopo radioativo pode ser detectado por meios tais como o uso de um contador γ ou um contador de cintilação ou pela autorradiografia.

IV. Imunoconjugados

Em um outro aspecto, a presente invenção caracteriza um anticorpo monoclonal anti-CD20 humano conjugado a uma porção terapêutica, tal como uma citotoxina, um medicamento (por exemplo, um imunossupressor) ou um radioisótopo. Tais conjugados são aqui aludidos como “imunoconjugados”. Os imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são aludidos como “imunotoxinas.” Uma citotoxina ou agente citotóxico incluem qualquer agente que seja prejudicial às células (por exemplo, que as mate). Os exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puomicina e análogos ou homólogos destes.

Os agentes terapêuticos adequados para formar imunoconjugados da invenção incluem, mas não são limitados a, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes alquiladores (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucila, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorubicina (antes daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina). Em uma forma de realização preferida, o agente terapêutico é um agente citotóxico ou um agente radiotóxico. Em uma outra forma de realização, o agente terapêutico é um imunossupressor. Já em uma outra forma de realização, o agente terapêutico é GM-CSF. Em uma forma de realização preferida, o agente terapêutico é doxorubicina, cisplatina,

bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucila, ciclofosfamida ou ricina A.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados a um radioisótopo, por exemplo, iodo-131, ítrio-90 ou índio-111, para gerar produtos radiofarmacêuticos citotóxicos para o tratamento de um

5 distúrbio relacionado com CD20, tal como um câncer. Os anticorpos conjugados da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica e a porção de medicamento não deve ser interpretada como limitante aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de medicamento pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possuam uma

10 atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa ou fragmento ativo desta, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *pseudomonas* ou toxina da difteria; uma proteína tal como fator de necrose de tumor ou interferon- γ ; ou, modificadores de resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"),

15 interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago ("GM-CSF"), fator estimulador de colônia de granulócito ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

As técnicas para conjugar tal porção terapêutica aos anticorpos são bem conhecidas, ver, por exemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies

20 For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243 a 256 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623 a 653 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents

25 In Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475 a 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303 a 316

(Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119 a 158 (1982).

Em uma outra forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos de acordo com a invenção são ligados a um ligador-quelador, por exemplo, tiuxetan, que permite que o anticorpo seja conjugado a um radioisótopo.

V. Composições Farmacêuticas

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais humanos da presente invenção. As composições farmacêuticas podem ser formuladas com carregadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis assim como quaisquer outros adjuvantes e excipientes conhecidos de acordo com as técnicas convencionais tais como aquelas divulgadas em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Em uma forma de realização, as composições incluem uma combinação de anticorpos isolados humanos múltiplos (por exemplo, dois ou mais) da invenção que atuam por mecanismos diferentes, por exemplo, um anticorpo que predominantemente atua pela indução de CDC em combinação com um outro anticorpo que predominantemente atua pela indução da apoptose.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição da presente invenção com pelo menos um agente anti-inflamatório ou pelo menos um agente imunossupressivo. Em uma forma de realização tais agentes terapêuticos incluem um ou mais agentes anti-inflamatório, tais como um medicamento esteroideal ou um NSAID (medicamento anti-inflamatório não esteroideal). Os agentes preferidos incluem, por exemplo, aspirina e outros

salicilatos, inibidores de Cox-2, tais como rofecoxib (Vioxx) e celecoxib (Celebrex), NSAIDs tais como ibuprofen (Motrin, Advil), fenoprofen (Nalfon), naproxen (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), cetoprofen (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozin (Diapro) e indometacina (Indocin).

Em uma outra forma de realização, tais agentes terapêuticos incluem um ou mais DMARDs, tais como metotrexato (Rheumatrex), hidroxicloroquina (Plaquenil), sulfasalazina (Asulfidine), inibidores da síntese de pirimidina, por exemplo, leflunomida (Arava), agentes bloqueadores do receptor IL-1, por exemplo, anakinra (Kineret) e agentes bloqueadores de TNF- α , por exemplo, etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade) e adalimumab.

Em uma outra forma de realização, tais agentes terapêuticos incluem um ou mais agentes imunossupressivos, tais como ciclosporina (Sandimmune, Neoral) e azatioprina (Imural).

Já em uma outra forma de realização, tais agentes terapêuticos incluem um ou mais quimioterapêuticos, tais como doxorubicina (Adriamicina), cisplatina (Platinol), bleomicina (Blenoxane), carmustina (Gliadel), ciclofosfamida (Citoxan, Procritox, Neosar) e clorambucila (Leukeran).

Em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos da presente invenção podem ser administrados em combinação com clorambucila e prednisolona; ciclofosfamida e prednisolona; ciclofosfamida, vincristina e prednisona; ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e prednisona; fludarabina e antraciclina; ou em combinação com outros regimes de medicamento múltiplo comuns para NHL, tais como divulgados, por exemplo, em Non-Hodgkin's Lymphomas: Making sense of Diagnosis, Treatment and Options, Lorraine Johnston, 1999, O'Reilly and Associates, Inc.

Já em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos podem ser administrados em conjunção com radioterapia e/ou transplante de célula tronco periférica autóloga ou medula óssea.

Ainda em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos podem ser administrados em combinação com um ou mais anticorpos selecionados de anticorpos anti-CD25, anticorpos anti-CD19, anticorpos anti-CD21, anticorpos anti-CD22, anticorpos anti-CD37, anticorpos anti-CD38, anticorpos anti-IL6R, anticorpos anti-IL8, anticorpos anti-IL15, anticorpos anti-IL15R, anticorpos anti-CD4, anticorpos anti-CD11a (por exemplo, efalizumab), anticorpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4) (por exemplo, natalizumab) e CTLA4-Ig.

Em uma forma de realização particular, os anticorpos monoclonais humanos são administrados em combinação com um anticorpo anti-CD25 para o tratamento de pênfigo bolhoso, por exemplo, em pacientes com doença do enxerto-versus-hospedeiro.

Em uma outra forma de realização particular, os anticorpos monoclonais humanos são administrados em combinação com um ou mais anticorpos selecionados de anticorpos anti-CD19, anticorpos anti-CD21, anticorpos anti-CD22, anticorpos anti-CD37 e anticorpos anti-CD38 para o tratamento de doenças malignas.

Ainda em uma outra forma de realização particular, os anticorpos humanos são administrados em combinação com um ou mais anticorpos selecionados de anticorpos anti-IL6R, anticorpos anti-IL8, anticorpos anti-IL15, anticorpos anti-IL15R, anticorpos anti-CD4, anticorpos anti-CD11a (por exemplo, efalizumab), anticorpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4) (por exemplo, natalizumab) e CTLA4-Ig para o tratamento de doenças inflamatórias.

Já em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos podem ser administrados em combinação com um anticorpo anti-C3b(i) de

modo a realçar a ativação de complemento.

Como aqui usado, “carregador farmacologicamente aceitável” inclui qualquer um e todos solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores de absorção e outros que sejam fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o carregador é adequado para a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, do composto ativo, isto é, anticorpo, molécula biespecífica e multiespecífica, podem ser revestidos em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

Um “sal farmacologicamente aceitável” refere-se a um sal que retenha a atividade biológica desejada do composto precursor e não comunicam quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (ver por exemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1 a 19). Os exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e outros, assim como de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanóicos substituídos com fenila, ácidos hidróxi alcanóico, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e outros. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalinos terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e outros, assim como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglicamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e outros.

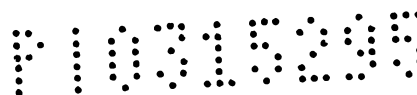
Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será avaliado pelo técnico habilitado, a via e/ou modo de administração variará dependendo

dos resultados desejados. Os compostos ativos podem ser preparados com carregadores que protegerão o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos e sistemas de liberação microencapsuladas. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para a preparação de tais formulações são no geral conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Ver, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

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

Os carregadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para as substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto à medida em que quaisquer meios ou agente convencionais sejam incompatíveis com o composto ativo, o seu uso nas composições farmacêuticas da invenção é considerado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura



ordenada adequada para alta concentração de medicamento. O carregador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e outros) e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada incluindo-se na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido pela microfiltração de esterilização. No geral, as dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem a vácuo e a secagem por congelamento (liofilização) que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução deste anteriormente filtrada estéril.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo único pode ser administrado, diversas doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma unitária

de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma unitária de dosagem como aqui usada refere-se às unidades fisicamente separadas adaptadas como dosagens unitárias para os pacientes a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade pré determinada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carregador farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção é ditada e diretamente dependente (a) das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser obtido e (b) das limitações inerentes na técnica de combinar um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

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

Para as composições terapêuticas, as formulações da presente invenção incluem aquelas adequadas para a administração oral, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na técnica da farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carregador para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do paciente que é tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carregador para produzir uma forma de dosagem única no geral será aquela quantidade da composição que produza um efeito terapêutico. No geral, fora

dos cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, preferivelmente de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, o mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento.

- 5 As formulações da presente invenção que são adequadas para a administração vaginal também incluem pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de pulverização contendo tais carregadores como é conhecido na técnica como sendo apropriado. As formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica de composições desta invenção
- 10 incluem pós, pulverizações, ungüentos, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um carregador farmacêuticamente aceitável e com quaisquer preservantes, tampões ou propelentes que possam ser requeridos.

- As frases “administração parenteral” e “parenteralmente
- 15 administrado” como aqui usado significa modos de administração outros que não a administração enteral e tópica, usualmente pela injeção e inclui, sem limitação, as injeções e infusões intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular,
- 20 subcapsular, subaracnóide, intraespinal, epidural e intraesternal.

- Os exemplos de carregadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e outros) e misturas adequadas destes, óleos vegetais, tais
- 25 como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões e pelo uso de tensoativos.

Estas composições também podem conter adjuvantes tais

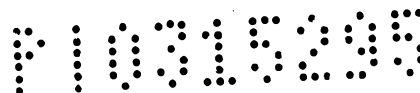
como preservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microorganismos pode ser garantida tanto pelos procedimentos de esterilização, acima e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico e outros. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e outros nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pela inclusão de agentes que retardam a absorção tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

10 Em uma forma de realização os anticorpos monoclonais humanos da invenção são administrados na forma cristalina pela injeção subcutânea, conforme Yang *et al.* (2003) PNAS, 100(12): 6934 a 6939.

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

Independente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção, que podem ser usados em uma forma hidratada adequada, e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção, são formuladas em formas de dosagem farmacêuticamente aceitáveis pelos métodos convencionais conhecidos por aqueles de habilidade na técnica.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a se obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para se obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração particulares, sem que seja tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da



presente invenção utilizadas ou do éster, sal ou amida destas, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular que é utilizado, da duração do tratamento, outros medicamentos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares utilizadas, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente que é tratado e outros fatores bem conhecidos nas técnicas médicas.

Um médico ou veterinário tendo habilidade comum na técnica pode facilmente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica requerida. Por exemplo, o médico ou veterinário pode iniciar doses dos compostos da invenção utilizadas na composição farmacêutica em níveis mais baixos do que aqueles requeridos de modo a obter o efeito terapêutico desejado e gradualmente aumentar a dosagem até que o efeito desejado seja obtido. No geral, uma dose diária adequada de uma composição da invenção será aquela quantidade do composto que é a dose eficaz mais baixa para produzir um efeito terapêutico. Uma tal dose eficaz no geral dependerá dos fatores descritos acima. É preferido que a administração seja intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea, preferivelmente administrada próxima ao local do alvo. Se desejado, a dose diária eficaz de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas, três, quatro, cinco, seis ou mais sub-doses administradas separadamente em intervalos apropriados por todo o dia, opcionalmente, nas formas de dosagem unitárias. Embora seja possível para um composto da presente invenção ser administrado sozinho, é preferível administrar o composto como uma formulação farmacêutica (composição).

Em uma forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos de acordo com a invenção podem ser administrados pela infusão em uma dosagem semanal de 10 a 500 mg/m², tal como 200 a 400 mg/m². Tal administração pode ser repetida, por exemplo, de 1 a 8 vezes, tais como 3 a 5

vezes. A administração pode ser realizada pela infusão contínua em um período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

Em uma outra forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos são administrados pela infusão contínua lenta em um período longo, tal como mais do que 24 horas, de modo a reduzir os efeitos colaterais tóxicos.

Ainda em uma outra forma de realização os anticorpos monoclonais humanos são administrados em uma dosagem semanal de 250 mg a 2000 mg, tais como por exemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg ou 2000 mg, por até 8 vezes, tal como de 4 a 6 vezes. A administração pode ser realizada pela infusão contínua em um período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Tal regime pode ser repetido uma ou mais vezes como necessário, por exemplo, depois de 6 meses ou 12 meses. A dosagem pode ser determinada ou ajustada medindo-se a quantidade de anticorpos monoclonais anti-CD20 circulantes na administração em uma amostra biológica usando-se anticorpos anti-idiotípicos que alvejem os anticorpos anti-CD20.

Já em uma outra forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos são administrados pela terapia de manutenção, tais como, por exemplo, uma vez por semana por um período de 6 meses ou mais.

Ainda em uma outra forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos de acordo com a invenção podem ser administrados por um regime incluindo uma infusão de um anticorpo monoclonal humano contra CD20 seguido por uma infusão de um anticorpo monoclonal humano contra CD20 conjugado a um radioisótopo. O regime pode ser repetido, por exemplo, 7 a 9 dias mais tarde.

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

administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos divulgados na US 5.399.163; US 5.383.851; US 5.312.335; US 5.064.413; US 4.941.880; US 4.790.824; ou US 4.596.556. Os exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: a US 4.487.603, que divulga uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar a medicação em uma taxa controlada; a US 4.486.194, que divulga um dispositivo terapêutico para a administração de medicamentos através da pele; a US 4.447.233, que divulga uma bomba de infusão de medicação para liberar medicação em uma taxa de infusão precisa; a US 4.447.224, que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para a liberação de medicamento contínua; a US 4.439.196, que divulga um sistema de liberação de medicamento osmótico tendo compartimentos de câmara múltipla; e US 4.475.196, que divulga um sistema de liberação de medicamento osmótico. Muitos outros de tais implantes, sistemas de liberação e módulos são conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

Em certas formas de realização, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para garantir a distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para os métodos de fabricar lipossomas, ver, por exemplo, a US 4.522.811, US 5.374.548 e US 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas em células ou órgãos específicos, realçando assim a liberação de medicamento alvejada (ver, por exemplo, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). As porções de alvejamento exemplares incluem foliato ou biotina (ver, por exemplo, a US 5.416.016 concedida a Low *et al.*); manósídeos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Comun. 153:



1038); anticorpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor em proteína A tensoativa (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134), espécies diferentes que podem compreender as formulações das invenções, assim como componentes das moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); ver também K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273. Em uma forma de realização da invenção, os compostos terapêuticos da invenção são formulados em lipossomas; em uma forma de realização mais preferida, os lipossomas incluem uma porção alvejadora. Em uma forma de realização mais preferida, os compostos terapêuticos nos lipossomas são liberados pela injeção de bolo a um local próximo à área desejada, por exemplo, o local de inflamação ou infecção ou o local de um tumor. A composição deve ser fluida até o grau em que seringabilidade fácil exista. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenagem e deve ser preservada contra a ação contaminante de microorganismos tais como bactérias e fungos.

Em uma outra forma de realização, anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para impedir ou reduzir o seu transporte através da placenta. Isto pode ser feito pelos métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pela PEGuilação dos anticorpos ou pelo uso de fragmentos F(ab)₂'. Outras referências podem ser feitas a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. J Immunol Methods. 152: 177 a 190; e a "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann Allergy Asthma Immunol 74: 279 a 283. Isto é particularmente relevante quando os anticorpos são usados para o tratamento ou prevenção do aborto espontâneo recorrente.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" para a terapia de

tumor pode ser medida pelas respostas de tumor objetivas que podem ser completas ou parciais. Uma resposta completa (CR) é definida como nenhuma evidência clínica, radiológica ou outra evidência de doença. Um resposta parcial (PR) resulta de uma redução no tamanho do tumor agregado de mais do que 50 %. O tempo médio para a progressão é uma medida que caracteriza a durabilidade da resposta de tumor objetiva.

Uma “dosagem terapeuticamente eficaz” para a terapia de tumor também pode ser medida pela sua capacidade para estabilizar a progressão de doença. A capacidade de um composto para inibir o câncer pode ser avaliada em um sistema modelo de animal preditivo da eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando-se a capacidade do composto para inibir o crescimento ou apoptose da célula pelos ensaios *in vitro* conhecidos pelo técnico habilitado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor ou de outro modo melhorar os sintomas em um paciente. Uma pessoa de habilidade comum na técnica pode ser capaz de determinar tais quantidades com base em fatores tais como o tamanho do paciente, a gravidade do sintoma do paciente e da composição particular ou via de administração selecionada.

Uma “dosagem terapeuticamente eficaz” para a artrite reumatóide preferivelmente resultará em uma Definição Preliminar ACR20 de Melhora nos pacientes, mais preferido em uma Definição Preliminar ACR50 de Melhora e ainda mais preferido em uma Definição Preliminar ARC70 de Melhora.

A Definição Preliminar ACR20 de Melhora é definida como:
 ≥ 20 % de melhora em: Tender Joint Count (TCJ) e Swollen Joint Count (SWJ)
 e ≥ 20 % de melhora em 3 das seguintes 5 avaliações: Patient Pain Assessment (VAS), Patient Global Assessment (VAS), Physician Global

Assessment (VAS), Patient Self-Assessed Disability (HAQ), Acute Phase Reactant (CRP ou ESR).

ACR50 e ACR70 são definidos do mesmo modo com $\geq 50\%$ e $\geq 70\%$ de melhoras, respectivamente. Para mais detalhes ver Felson *et al.* em American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism (1995) 38: 727 a 735.

A composição deve ser estéril e fluida até o grau em que a composição seja liberável pela seringa. Além de água, o carregador pode ser uma solução salina tamponada isotônica, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e outros) e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, é preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol ou sorbitol e cloreto de sódio na composição. A absorção de longa duração das composições injetáveis pode ser realizada incluindo-se na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

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

Usos e Métodos da Invenção

Os anticorpos humanos (incluindo imunconjugados, biespecíficos/multiespecíficos, composições e outro derivados aqui descritos) da presente invenção têm numerosas utilidades de diagnóstico e terapêuticas *in vitro* e *in vivo* que envolvem o diagnóstico e o tratamento de distúrbios que envolvem as células que expressam CD20. Por exemplo, os anticorpos podem ser administrado às células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo* ou a

pacientes humanos, por exemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir e diagnosticar uma variedade de distúrbios. Como aqui usado, o termo “paciente” é intencionado a incluir animais humanos e não humanos que respondem aos anticorpos humanos contra CD20. Os pacientes preferidos incluem pacientes humanos tendo distúrbios que possam ser corrigidos ou melhorados pela inibição ou controle de células B (normais ou malignas).

Por exemplo, em uma forma de realização, os anticorpos humanos da presente invenção podem ser usados para tratar um paciente com um distúrbio tumorigênico, por exemplo, um distúrbio caracterizado pela presença de células de tumor que expressam CD20 incluindo, por exemplo, linfoma de célula B, por exemplo, NHL. Os exemplos de doenças tumorigênicas que podem ser tratadas e/ou prevenidas incluem linfoma de célula B, por exemplo, NHL, incluindo leucemia /linfoma linfoblástica de célula B precursores e neoplasmas de célula B maduros, tais como leucemia linfocítica crônica de célula B (CLL)/linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia prolinfocítica de célula B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de célula de manto (MCL), linfoma folicular (FL), incluindo FL de grau baixo, grau intermediário e grau alto, linfoma do centro de folículo cutâneo, linfoma de célula B de zona marginal (MALT tipo nodal e tipo esplênico), leucemia de célula pilosa, linfoma de célula B grande difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de célula plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós transplante, macroglobulinemia de Waldenström e linfoma de célula grande anaplástico (ALCL).

Outros exemplos de linfomas não de Hodgkin de célula B são granulomatose linfomatóide, linfoma de efusão primária, linfoma de célula B intravascular grande, linfoma de célula B mediastinal grande, doenças de cadeia pesada (incluindo doença de γ , μ e α), linfomas induzidos pela terapia com agentes imunossupressivos, tais como linfoma induzido por ciclosporina e linfoma induzido por metotrexato.

Em uma outra forma de realização, os anticorpos humanos da presente invenção podem ser usados para tratar o linfoma de Hodgkin.

Os exemplos de distúrbios imune em que as células B que expressam CD20 estão envolvidas e que podem ser tratados e/ou prevenidos incluem distúrbios autoimunes, tais como psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma sistêmico e esclerose, doença do intestino inflamatório (IBD), doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência na adesão de leucócito, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behçet, nefrite do complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imuno-mediadas, tais como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefrite de lupo, lupo eritematoso sistêmico, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, granulomatose de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, HIV e doenças associadas ao vírus do herpes. Outros exemplos são a síndrome da angústia respiratória aguda grave e coreoretinite. Além disso, outras doenças e distúrbios incluem aquelas causadas ou mediada pela infecção de células B com vírus, tais como o vírus Epstein-Barr (EBV).

Outros exemplos de distúrbios inflamatórios, imunes e/ou autoimunes em que os autoanticorpos e/ou a atividade de linfócito B excessiva são proeminentes e que podem ser tratadas e/ou prevenidas, incluem os seguintes:

vasculites e outros distúrbios de vaso, tais como a poliangiíte microscópica, síndrome de Churg-Strauss e outras vasculites ANCA-associadas, poliarterite nodosa, vasculite crioglobulinêmica essencial, angiíte leucocitoclástica cutânea, doença de Kawasaki, arterite de Takayasu, artrite de

célula gigante, púrpura Henoch-Schönlein, angiíte cerebral primária ou isolada, eritema nodoso, tromboangiíte obliterante, púrpura trombocitopênica trombótica (incluindo a síndrome urêmica hemolítica) e vasculites secundárias, incluindo a vasculite leucocitoclástica cutânea (por exemplo, secundário à hepatite B, hepatite C, macroglobulinemia de Waldenström, neoplasias de célula B, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren ou lupo eritematoso sistêmico); outros exemplos são eritema nodoso, vasculite alérgica, paniculite, doença de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinêmica e doença de Buerger;

10 distúrbios da pele, tais como dermatite de contato, dermatose de IgA linear, vitiligo, pioderma gangrenoso, epidermólise bolhosa adquirida, pênfigo vulgar (incluindo penfigóide cicatricial e pênfigo bolhoso), alopecia areata (incluindo alopecia universal e alopecia total), dermatite herpetiforme, eritema multiforme e urticária autoimune crônica (incluindo edema angioneurótico e vasculite urticarial);

15 citopenias imuno-mediadas, tais como neutropenia autoimune e aplasia de célula vermelha pura;

20 distúrbios do tecido conectivo, tais como lupo CNS, lupo eritematoso discóide, síndrome de CREST, doença do tecido conectivo misto, polimiosite/dermatomiosite, miosite de corpo de inclusão, amiloidose secundária, crioglobulinemia tipo I e tipo II, fibromialgia, síndrome do anticorpo fosfolipídico, hemofilia secundária, policondrite recorrente, sarcoidose, síndrome do homem rígido e febre reumática; um outro exemplo é a fasciíte eosinofílica;

25 artrites, tais como espondilite ancilosante, artrite juvenil crônica, doença de Still do adulto e síndrome de SAPHO; outros exemplos são sacroileíte, artrite reativa, doença de Still e gota;

distúrbios hematológicos, tais como anemia aplástica, anemia hemolítica primária (incluindo síndrome de aglutininas frias), anemia



hemolítica secundária para CLL ou lupo eritematoso sistêmico; síndrome de POEMS, anemia perniciosa e púrpura hiperglobulinêmica de Waldenström; outros exemplos são agranulocitose, neutropenia autoimune, doença de Franklin, doença de Seligmann, doença da cadeia μ , síndrome paraneoplástica secundária para timoma e linfomas e formação de inibidor do Fator VIII;

5 endocrinopatias, tais como poliendocrinopatia e doença de Addison; outros exemplos são hipoglicemia autoimune, hipotireoidismo autoimune, síndrome da insulina autoimune, tireoidite de Quervain e resistência à insulina mediada pelo receptor de anticorpo;

10 distúrbios hepato-gastrointestinais, tais como a doença celíaca, doença de Whipple, cirrose biliar primária, hepatite ativa crônica e colangiite esclerosante primária; um outro exemplo é a gastrite autoimune;

nefropatias, tais como a glomerulonefrite progressiva rápida, nefrite pós estreptocócica, síndrome de Goodpasture, glomerulonefrite membranosa e nefrite crioglobulinêmica; um outro exemplo é a doença da mudança mínima;

distúrbios neurológicos, tais como neuropatias autoimunes, mononeuropatia múltipla, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, córeia de Sydenham, tabes dorsal e síndrome de Guillain-Barré; outros exemplos são

20 mielopatia/paraparesia espástica tropical, miastenia grave, polineuropatia desmielinante inflamatória aguda e polineuropatia desmielinante inflamatória crônica;

distúrbios cardíacos e pulmonares, tais como alveolite fibrosante, bronquiolite obliterante, aspergilose alérgica, fibrose cística, síndrome de Löffler, miocardite e pericardite; outros exemplos são

25 pneumonite de hipersensibilidade e síndrome paraneoplástica secundária ao câncer pulmonar;

distúrbios alérgicos, tais como asma brônquica e síndrome de hiper-IgE; um outro exemplo é amaurose fugaz;

distúrbios oftalmológicos, tais como a coriorretinite idiopática; doenças infecciosas, tais como infecção pelo parvovírus B (incluindo a síndrome de *hands-and-socks*); e

5 distúrbios ginecológicos-obstréticos, tais como o aborto recorrente, perda fetal recorrente e retardo do crescimento intrauterino; um outro exemplo é a síndrome paraneoplástica secundária aos neoplasmos ginecológicos;

distúrbios reprodutivos masculinos, tais como síndrome paraneoplástica secundária aos neoplasmos testiculares; e

10 distúrbios derivados do transplante, tais como rejeição ao aloenxerto e xenoenxerto e doença do enxerto-versus-hospedeiro.

Em uma forma de realização, a doença é um distúrbio inflamatório, imune e/ou autoimune selecionados de colite ulcerativa, doença de Crohn, diabetes juvenil, esclerose múltipla, trombocitopenias imuno-
15 mediadas, tais como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica (incluindo anemia hemolítica autoimune), miastenia grave, esclerose sistêmica e pênfigo vulgar.

Em uma outra forma de realização, anticorpos humanos da invenção podem ser usados para detectar níveis de CD20 ou níveis de células
20 que contém CD20 na sua superfície de membrana, cujos níveis podem ser depois ligados a certos sintomas de doença. Alternativamente, os anticorpos podem ser usados para esgotar ou interagir com a função de células que expressam CD20, implicando deste modo estas células como mediadores importantes da doença. Isto podem ser obtido contatando-se uma amostra e
25 uma amostra de controle com o anticorpo anti-CD20 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e CD20. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e CD20 são detectados e comparados na amostra e no controle.

Anticorpos humanos da invenção podem ser inicialmente

testados quanto a atividade de ligação associada com o uso terapêutico ou de diagnóstico *in vitro*. Por exemplo, os anticorpos podem ser testados usando ensaios citométricos de fluxo descritos nos Exemplos abaixo. Além disso, a atividade dos anticorpos em deflagrar pelo menos uma atividade de célula efetora mediada pelo efetor, incluindo inibir o crescimento e/ou a morte de células que expressam CD20, podem ser ensaiadas. Por exemplo, a capacidade dos anticorpos para deflagrar CDC e/ou apoptose podem ser ensaiadas. Protocolos para ensaiar quanto a CDC, a adesão homotípica, formação de cacho molecular ou apoptose são descritos nos Exemplos abaixo.

10 Os anticorpos humanos da invenção também têm utilidade adicional na terapia e diagnóstico de uma variedade de doenças relacionadas com a CD20. Por exemplo, os anticorpos humanos podem ser usados para evocar *in vivo* ou *in vitro* uma ou mais das seguintes atividades biológicas: para inibir o crescimento e/ou a diferenciação de uma célula que expressa
15 CD20; para matar uma célula que expressa CD20; para mediar a fagocitose ou ADCC de uma célula que expressa CD20 na presença de células efetoras humanas; para mediar CDC de uma célula que expressa CD20 na presença de complemento; para mediar a apoptose de uma célula que expressa CD20; para induzir a adesão homotípica; e/ou para induzir a translocação em balsas
20 lipídicas na ligação de CD20.

Em uma forma de realização particular, os anticorpos humanos são usados *in vivo* para tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de doenças relacionadas com a CD20. Os exemplos de doenças relacionadas com a CD20 incluem, entre outros, linfoma de célula B, por exemplo, NHL e
25 doenças imunes, por exemplo, doenças autoimunes, tais como aquelas listadas acima.

Em uma forma de realização particular, os anticorpos da invenção são usados para tratar ou para impedir NHL, visto que os anticorpos esgotam as células de tumor que carregam CD20).



O linfoma não de Hodgkin é um tipo de linfoma de célula B.

Os linfomas, por exemplo, linfomas de célula B, são um grupo de cânceres relacionados que surgem quando um linfócito (uma célula sangüínea) torna-se maligna. A função normal dos linfócitos é defender o corpo contra invasores:

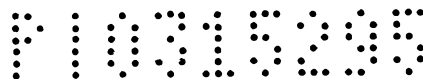
5 germes, vírus, fungos, e ainda câncer. Existem muitos subtipos e estágios de maturação de linfócitos e, portanto, existem muitos tipos de linfomas. Como as células normais, os linfócitos malignos podem se mover para muitas partes do corpo. Tipicamente, as células de linfoma formam tumores no sistema linfático: medula óssea, linfônodos, baço e sangue. Entretanto, estas células
10 podem migrar para outros órgãos. Certos tipos de linfoma tenderão a crescer em locais em que a versão normal da célula reside. Por exemplo, é comum para os tumores NHL foliculares desenvolverem-se nos linfônodos.

A CD20 é usualmente expressada em níveis elevados nas células B neoplásticas (isto é, tumorigênicas) associadas com NHL.

15 Conseqüentemente, anticorpos que se ligam à CD20 da invenção podem ser usados para esgotar as células de tumor que carregam CD20 que levam ao NHL e, assim, podem ser usadas para impedir ou tratar esta doença.

Anticorpos humanos (por exemplo, anticorpos monoclonais humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da presente invenção
20 também podem ser usados para bloquear ou inibir outros efeitos de CD20. Por exemplo, é conhecido que a CD20 é expressada em linfócitos B e está envolvida na proliferação e/ou diferenciação destas células. Visto que os linfócitos B funcionam como imunomoduladores, a CD20 é um alvo importante para a terapia mediada pelo anticorpo para alvejar linfócitos B, por
25 exemplo, para inativar ou matar linfócitos B, envolvidos em distúrbios autoimunes. Tais distúrbios autoimunes incluem, por exemplo, as doenças listadas acima

As vias adequadas de administrar as composições de anticorpo (por exemplo, anticorpos monoclonais humanos, moléculas e



imunoconjugados multiespecíficos e biespecíficos) da invenção *in vivo* e *in vitro* são bem conhecidos na técnica e podem ser selecionados por aqueles de habilidade comum. Por exemplo, as composições de anticorpo podem ser administradas pela injeção (por exemplo, intravenosa ou subcutânea). As dosagens adequadas das moléculas usadas dependerá da idade e peso do paciente e da concentração e/ou formulação da composição de anticorpo. Além disso, a carga de tumor pode ser determinada e usada para calcular as dosagens adequadas.

Como anteriormente descrito, os anticorpos anti-CD20 humanos da invenção podem ser co-administrados com um ou outros mais agentes terapêuticos, por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressivo. Os anticorpos podem ser ligados ao agente (como um imunocomplexo) ou podem ser administrados separados do agente. No último caso (a administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, depois ou concorrentemente com o agente ou pode ser co-administrado com outras terapias conhecidas, por exemplo, uma terapia anticâncer, por exemplo, radiação. Tais agentes terapêuticos incluem, entre outros, agentes anti-neoplásicos tais como doxorubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, clorambucila e ciclofosfamida. A co-administração dos anticorpos anti-CD20 humanos da presente invenção com agentes quimioterapêuticos fornece dois agentes anticâncer que operam por intermédio de mecanismos diferentes que produzem um efeito citotóxico às células de tumor humanas. Tal co-administração pode resolver problemas devido ao desenvolvimento de resistência a medicamentos ou uma mudança na antigenicidade das células de tumor que as tornaria não reativas com o anticorpo.

As células efetoras alvo-específicas, por exemplo, células efetoras ligadas às composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção também podem ser



usadas como agentes terapêuticos. As células efetoras para alvejamento podem ser leucócitos humanos tais como macrófagos, neutrófilos ou monócitos. Outras células incluem eosinófilos, células matadoras naturais e outras células que carregam receptor de IgG ou IgA. Se desejado, as células efetoras podem ser obtidas a partir do paciente a ser tratado. As células efetoras alvo-específicas, podem ser administradas como uma suspensão de células em uma solução fisiologicamente aceitável. O número de células administradas podem ser da ordem de 10^8 a 10^9 mas variarão dependendo do propósito terapêutico. No geral, a quantidade será suficiente para se obter a localização na célula alvo, por exemplo, uma célula de tumor que expresse CD20 e efetuar a matança celular, por exemplo, pela fagocitose. As vias de administração também podem variar.

A terapia com células efetoras alvo-específicas pode ser realizada em conjunção com outras técnicas para a remoção de células alvejadas. Por exemplo, a terapia anti-tumor usando as composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção e/ou células efetoras armadas com estas composições pode ser usada em conjunção com a quimioterapia. Adicionalmente, a imunoterapia de combinação pode ser usada para direcionar duas populações efetoras citotóxicas distintas voltadas para a rejeição de célula de tumor. Por exemplo, anticorpos anti-CD20 ligados a anti-Fc- γ RI ou anti-CD3 podem ser usados em conjunção com agentes específicos de ligação de receptor de IgG ou IgA.

As moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção também pode ser usadas para modular os níveis de Fc γ R ou Fc α R nas células efetoras, tais como pelo encapuzamento e eliminação de receptores na superfície da célula. Misturas de receptores anti-Fc também podem ser usadas para este propósito.

As composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção que têm



sítios de ligação de complemento, tais como porções de IgG1, -2 ou -3 ou IgM que se ligam a complemento, também podem ser usados na presença de complemento. Em uma forma de realização, o tratamento *ex vivo* de uma população de células que compreende células alvos com um agente de ligação da invenção e células efetoras apropriadas pode ser suplementado pela adição de complemento ou soro contendo complemento. A fagocitose de células alvo revestidas com um agente de ligação da invenção pode ser melhorada pela ligação de proteínas de complemento. Em uma outra forma de realização as células alvo revestidas com as composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção também podem ser lisadas pelo complemento. Já em uma outra forma de realização, as composições da invenção não ativam o complemento.

As composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção também podem ser administradas junto com complemento. Conseqüentemente, dentro do escopo da invenção estão as composições que compreendem anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas e soro ou complemento. Estas composições são vantajosas em que o complemento está localizado em proximidade imediata aos anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas. Alternativamente, os anticorpos humanos, as moléculas multiespecíficas ou biespecíficas da invenção e o complemento ou soro podem ser administrados separadamente. A ligação das composições da presente invenção para alvejar células causa a translocação do antígeno do complexo CD20-anticorpo em balsas lipídicas da membrana celular. Tal translocação cria uma alta densidade de complexos antígeno-anticorpo que podem ativar e/ou realçar eficientemente CDC.

Também dentro do escopo da presente invenção estão kits que compreendem as composições de anticorpo da invenção (por exemplo, anticorpos humanos e imunoconjugados) e instruções para o uso. O kit pode

conter ainda um ou mais reagentes adicionais, tais como um reagente imunossupressivo, um agente citotóxico ou um agente radiotóxico ou um ou mais anticorpos humanos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo humano tendo uma atividade complementar).

5 Conseqüentemente, pacientes tratados com composições de anticorpo da invenção podem ser adicionalmente administrados (antes, simultaneamente ou a seguir da administração de um anticorpo humano da invenção) com um outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou radiotóxico, que realce ou aumente o efeito terapêutico dos anticorpos

10 humanos.

 Em outras formas de realização, o paciente pode ser adicionalmente tratado com um agente que module, por exemplo, realce ou iniba, a expressão ou atividade de receptores $Fc\gamma$ ou $Fc\alpha$, por exemplo, pelo tratamento do paciente com uma citocina. As citocinas preferidas para a

15 administração durante o tratamento com a molécula multiespecífica incluem fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose de tumor (TNF).

 As composições (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção também podem ser usadas para

20 alvejar células que expressam $Fc\gamma R$ ou CD20, por exemplo para rotular tais células. Para tal uso, o agente de ligação pode ser ligado a uma molécula que possa ser detectada. Assim, a invenção fornece métodos para localizar células *ex vivo* ou *in vitro* que expressam receptores Fc, tais como $Fc\gamma R$ ou CD20. O

25 rótulo detectável pode ser, por exemplo, um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator de enzima.

 Em uma forma de realização particular, a invenção fornece métodos para detectar a presença de antígeno de CD20 em uma amostra ou medir a quantidade de antígeno de CD20, que compreende contatar a amostra

e uma amostra de controle, com um anticorpo monoclonal humano que especificamente se liga à CD20, sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção deste e a CD20. A formação de um complexo é depois detectada, em que uma diferença na formação de
5 complexo entre a amostra comparada com a amostra de controle é indicativa da presença de antígeno de CD20 na amostra.

Em outras formas de realização, a invenção fornece métodos para o tratamento de um distúrbio que envolva células que expressam CD20 em um paciente, por exemplo, linfoma não de Hodgkin ou artrite reumatóide,
10 pela administração ao paciente dos anticorpos humanos descritos acima. Tais anticorpos e derivados destes são usados para inibir as atividades induzidas pela CD20 associadas com certos distúrbios, por exemplo, proliferação e/ou diferenciação. Contatando-se o anticorpo com CD20 (por exemplo, pela administração do anticorpo a um paciente), a capacidade de CD20 para
15 induzir tais atividades é inibida e, assim, o distúrbio associado é tratado.

Conseqüentemente, em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece um método para o tratamento ou prevenção de um distúrbio tumorigênico que envolva células que expressam CD20, por exemplo, NHL. O método envolve administrar a um paciente uma
20 composição de anticorpo da presente invenção em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir o distúrbio. A composição de anticorpo pode ser administrada sozinha ou junto com um outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou um radiotóxico que atue em conjunção ou sinergisticamente com a composição de anticorpo para tratar ou prevenir as
25 doenças que envolvam células que expressam CD20. Em uma forma de realização particularmente preferida, a presente invenção fornece um método para o tratamento de linfoma não de Hodgkin.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção fornece um método para o tratamento ou prevenção de um distúrbio

autoimune que envolva células humanas que expressam CD20, por exemplo, aquelas doenças como listadas acima. O método envolve administrar a um paciente uma composição de anticorpo da presente invenção em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir o distúrbio. A composição de anticorpo pode ser administrada sozinha ou junto com um outro agente terapêutico, tal como um imunossupressor que atue em conjunção ou sinergisticamente com a composição de anticorpo para tratar ou prevenir a doença que envolva células que expressam CD20.

10 Ainda em uma outra forma de realização, a invenção fornece um método para detectar a presença ou quantificar a quantidade de células que expressam CD20 *in vivo* ou *in vitro*. O método compreende (i) administrar a um paciente uma composição (por exemplo, uma molécula multi- ou biespecífica) da invenção conjugada a um marcador detectável; (ii) expor o paciente a um meio para detectar o dito marcador detectável para
15 identificar áreas contendo células que expressam CD20.

Já em uma outra forma de realização, imunoconjugados da invenção podem ser usados para alvejar compostos (por exemplo, agentes terapêuticos, rótulos, citotoxinas, radiotoxinas imunossupressores, etc.) às células que têm CD20 expressada na sua superfície pela ligação de tais compostos ao anticorpo. Assim, a invenção também fornece métodos para
20 localizar células que expressam CD20 *ex vivo* ou *in vitro*, tais como as células de Reed-Sternberg (por exemplo, com um rótulo detectável, tal como um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator de enzima). Alternativamente, os imunoconjugados podem ser usados para matar
25 células que tenham CD20 expressada na sua superfície pelo alvejamento de citotoxinas ou radiotoxinas à CD20.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitantes.

EXEMPLOS

Linhagens de célula B usadas nos exemplos

Linhagem de célula	de Origem	Obtida de
Daudi	Linfoma de Burkitt Negróide	ECACC (85011437)
ARH-77	Leucemia de célula plasmática IgG	DSMZ (ACC 512)
DOHH	Linfoma de célula B imunoblástica refratária	DSMZ (ACC 47)
Raji	Linfoma de Burkitt Negróide	ECACC (85011429)
SU-DHL-4	B-NHL, linfoma histiocítico difuso	DSMZ (ACC 495)
Ramos-EHRB	Linfoma de Burkitt	ECACC (85030804)
Tanoue	Humano B-célula leucemia	DSMZ (ACC 399)

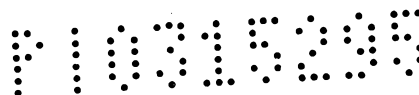
As linhagens de célula B, Daudi, ARH-77, DOHH, Raji, Ramos-EHRB e Tanoue foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal (FCS) (Optimum C241, Wisent Inc., st. Bruno, Canada), 2 mM de L-glutamina, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 1 mM de piruvato de sódio (todos da Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escócia).

A linhagem de célula B, SU-DHL-4 foi cultivada no mesmo meio mas sem piruvato de sódio.

As culturas foram mantida a 37°C em uma incubadora com 5 % de CO₂, umidificada, divididas e colhidas em 80 a 90 % de confluência. O meio foi renovado duas vezes por semana. Neste tempo as células foram divididas e semeadas de 1 a 1,5 x 10⁶ células/ml para garantir a viabilidade e crescimento ótimo.

Exemplo 1 Produção de Anticorpos Humanos Contra CD20

Camundongos HCo7 e KM: Anticorpos monoclonais totalmente humanos para CD20 foram preparados usando camundongos HCo7 e KM que expressam genes de anticorpo humano. Na cepa de camundongo KM, o gene da cadeia leve capa endógeno de camundongo foi homozigoticamente rompido como descrito em Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 811 a 820 e o gene da cadeia pesada endógeno de camundongo foi homozigoticamente rompido como descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Esta cepa de camundongo carrega um transgene de cadeia leve capa humana, KCo5, como descrito em Fishwild *et al.* (1996) Nature



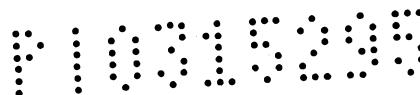
Biotechnology 14: 845 a 851. Esta cepa de camundongo também carrega um transcromossoma de cadeia pesada humana composto de cromossoma 14 fragmento hCF (SC20) como descrito na WO 02/43478.

Os camundongos HCo7 têm um rompimento JKD nos seus genes de cadeia leve (capa) endógenos (como descrito em Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821 a 830), um rompimento CMD nos seus genes de cadeia pesada endógenos (como descrito no Exemplo 1 da WO 01/14424), um transgene de cadeia leve capa humana KCo5 (como descrito em Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845 a 851) e um transgene de cadeia pesada humana HCo7 (como descrito na US 5.770.429).

Imunizações em Camundongos HCo7 e KM: Camundongos HCo7 e KM foram imunizados com células NS/0 transfectadas com CD20 humana. Para a primeira imunização, por camundongo, 1×10^7 células em 150 μ l de PBS foram misturados 1:1 com Adjuvante de Freund Completo e 15 injetados intraperitonealmente (i.p.). Imunizações i.p. subsequentes foram feitas usando uma quantidade similar de células sem adjuvante. Três e dois dias antes da fusão os camundongos foram intravenosamente reforçados com $0,5 \times 10^7$ células colocadas em suspensão em PBS.

A presença de anticorpos direcionados contra CD20 humana 20 no soro dos camundongos foi monitorada pela citometria de fluxo usando análise FACS, usando células NS/0 transfectadas com CD20 humana assim como células NS/0 precursoras negativas em CD20.

Geração de Hibridomas Que Produzem Anticorpos Monoclonais Humanos para CD20: Os esplenócitos de camundongo foram 25 isolados a partir do camundongos HCo7 e KM e fundidos com PEG a uma linhagem de célula de mieloma de camundongo com base em protocolos padrão. Os hibridomas resultantes foram depois triados quanto a produção de IgG, κ humano pelo ELISA e quanto a especificidade de CD20 usando células NS/0 e SKBR3 transfectadas com CD20 humanas pela análise FACS. As



suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados foram fundidos a um quarto do número de células de mieloma de camundongo não secretor SP2/0 (ATCC, CRL1581) com 50 % de PEG (Sigma). As células foram plaqueadas em aproximadamente 1 x 10⁵/reservatório em placa microtituladora de fundo chato, seguido por cerca de duas semanas de incubação em meio seletivo contendo 10 % de soro bovino fetal, 10 % de meio condicionado P388D1 (ATCC, CRL TIB-63), 3 a 5 % de *origen* (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com alto teor de glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Depois de 1 a 2 semanas, as células foram cultivadas em meio em que o HAT foi substituído com HT. Os reservatórios individuais foram depois triados pela citometria de fluxo para anticorpos IgG monoclonais anti-CD20 humanos. Uma vez que o crescimento de hibridoma extensivo ocorreu, o meio foi monitorado usualmente depois de 10 a 14 dias. Os hibridomas que secretam anticorpo foram replaqueados, triados mais uma vez e, se ainda positivos quanto aos anticorpos monoclonais anti-CD20 de IgG humana foram subclonados pela diluição limitante. Os subclones estáveis foram depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo no meio de cultura de tecido para a caracterização. Um clone de cada hibridoma, que reteve a reatividade de células precursoras (por FACS), foi escolhido. De 5 a 10 frascos de banco de célula foram gerados para cada clone e armazenados em nitrogênio líquido.

Seleção de Anticorpos Monoclonais Humanos Que se Ligam à CD20/Triagens Primárias: Para determinar o isótipo de anticorpos, um ELISA de isótipo foi realizado. Os reservatórios das placas de microtítulo foram revestidos com 1 µg/ml de cadeia leve capa anti-humana de camundongo, 50 µl/reservatório em PBS incubadas a 4 °C durante a noite. Depois de bloquear com 5 % de soro de frango, as placas foram reagidas com sobrenadante e

controle de isótipo purificado. As placas foram depois incubadas na temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Os reservatórios foram depois reagidos com sondas conjugadas com rábano peroxidase específica de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanas. As placas foram desenvolvidas e analisadas como descrito acima.

Quatro linhagens de célula de hibridoma foram geradas, três da fusão de camundongo KM e uma da fusão de camundongo HCo7, que expressam os seguintes anticorpos:

2F2: um anticorpo IgG1, κ monoclonal humano com as seqüências de nucleotídeo: SEQ ID NOs: 1 e 3 e as seqüências de aminoácido: SEQ ID NOs: 2 e 4.

4C9: um anticorpo IgG1, κ monoclonal humano com exatamente as mesmas seqüências de aminoácido como 2F2: SEQ ID NOs: 2 e 4.

7D8: um anticorpo IgG1, κ monoclonal humano com as seqüências de nucleotídeo: SEQ ID NOs: 5 e 7 e as seqüências de aminoácido: SEQ ID NOs: 6 e 8.

11B8: um anticorpo IgG3, κ monoclonal humano com as seqüências de nucleotídeo: SEQ ID NOs: 9 e 11 e as seqüências de aminoácido: SEQ ID NOs: 10 e 12.

O termo "2F2" é aqui usado para designar tanto o anticorpo derivado do clone de hibridoma 2F2 quanto o anticorpo idêntico derivado do clone de hibridoma 4C9.

Os anticorpos da invenção podem ser mudados para outros isótipos como determinado pelo animal transgênico ou transcromossômico não humano a partir do qual eles são derivados. Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo IgG3, κ monoclonal humano 11B8 pode ser mudado para um isótipo IgG1, κ monoclonal humano tendo exatamente as mesmas seqüências V_H e V_L . Em uma outra forma de realização, o anticorpo IgG1, κ

2F2 ou anticorpo IgG1, κ 7D8 podem ser mudados para um isótipo IgG2, IgG4, IgA1, IgA2 ou IgE monoclonal humano tendo exatamente as mesmas seqüências V_H e V_L .

Exemplo 2 Seqüenciamento de Anticorpo de Anticorpos Humanos

5 Contra CD20

Seqüenciamento das Regiões V_L e V_H

Preparação RNA: O RNA total foi preparado a partir de 5×10^6 células de todas as linhagens de célula de hibridoma HuMAb CD20 (2F2, 7D8 e 11B8) com kit RNeasy (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Baixos) de
10 acordo com o protocolo do fabricante.

Preparação de cDNA de 2F2 e 7D8: DNA complementar 5'-RACE-Ready (cDNA) de RNA foi preparado a partir de 1 μ g de RNA total, usando o kit de Amplificação de cDNA SMART RACE (Clontech), seguindo o protocolo do fabricante.

15 regiões V_H e V_L foram amplificadas usando um Kit advantage HF 2 PCR (Clontech, BD) e usando os seguintes iniciadores:

V_K RACE2 5' GCA GGC ACA CAA CAG AGG CAG TTC CAG ATT TC recoze em C-cap

V_H RACE2 5' GCT GTG CCC CCA GAG GTG CTC TTG GAG Grecoze em C_{H1}

Preparação de cDNA de 11B8: O DNA complementar (cDNA) de RNA a partir de células 11B8 foi preparado a partir de 3 μ g de RNA total com Transcriptase Reversa AMV com tampão (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), oligo d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, USA), dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e RNAsin (Promega) de
20 acordo com o protocolo do fabricante (2000, versão 3).

Os iniciadores de PCR usados para amplificar regiões V_H e V_L para clonagem:

25 Pares de iniciador usados:

V_H : Iniciadores FR1 5'

AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC

AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC

AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC

Iniciadores V_H líder 5'

AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC

AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg

AB87 ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg

AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC

AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT

Iniciador V_H 3'

AB90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg

V_K: Iniciadores FR1 5'

AB8 RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC

AB9 gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC

AB10 gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC

AB11 gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC

AB12 gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC

AB13 gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC

AB14 gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC

Iniciadores V_K líder 5'

AB123 CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg

AB124 CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC

AB125 CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC

AB126 ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC

5 Iniciador V_K 3'

AB16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

em que K = T ou G, S = C ou G, R = A ou G, Y = C ou T e W = A ou T.

Condições de PCR usadas para amplificar as regiões V_H e V_L para clonar 2F2 e 7D8: As reações de cadeia da polimerase (PCR) foram

realizadas com mistura de polimerase HF (Clonotech.) em um ciclador T1 (Biometra, Westburg).

Condições de PCR:

- 5 94°C 30 s 5 ciclos
72°C 1 min
94°C 30 s
70°C 30 s 5 ciclos
72°C 1 min
94°C 30 s
10 68°C 30 s 27 a 30 ciclos
72°C 1 min

Condições de PCR usadas para amplificar as regiões V_H e V_L para clonagem de 11B8: As reações de cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com AmpliTaq polimerase (Perkin Elmer) em um ciclador T1 (Biometra, Westburg, Leusden, Países Baixos).

Protocolo de ciclagem de PCR:

- 94°C 2 min
11 ciclos 94°C 30 s
65°C 30 s, menos 1°C por ciclo
20 72°C 30 s
30 ciclos 94°C 30 s
55°C 30 s
72°C 30 s
72°C 10 min
25 esfriar até 4°C

Clonagem de V_H e V_L em pGEMT-Vector System II (2F2, 7D8 e 11B8): Depois de analisar os produtos da PCR em um gel de agarose, os produtos foram purificados com o Kit de Extração em Gel QIAEX II (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Baixos). Dois produtos da PCR



independentemente amplificados de cada região V_H e V_L foram clonados em pGEMT-Vector System II (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante (1999, versão 6).

Depois da transformação para *E. coli* JM109, as colônias individuais foram triadas pela PCR de colônia usando iniciadores T7 e SP6, 30 ciclos de recozimento a 55°C. O DNA plasmídico das colônias foi purificado usando o kit Qiaprep Spin miniprep (Qiagen). Para analisar ainda mais as regiões V_H e V_L , uma digestão com NcoI/NotI (NE Biolabs, Westburg, Leusden, Países Baixos) foi realizada e analisada em gel de agarose.

Sequenciamento (2F2, 7D8 e 11B8): As regiões V foram sequenciadas depois da clonagem no pGEMT-Vetcor System II. O sequenciamento foi realizado em Baseclear (Leiden, Países Baixos). As seqüências foram analisadas alinhando-se as seqüências de gene V da linha germinativa em Vbase (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm). <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901>.

As seqüências obtidas são mostradas nas Figuras 53 a 58.

Exemplo 3 Produção recombinante de 2F2 e 11B8 em linhagem de célula GS-NS/0

2F2T: As regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve do anticorpo 2F2 foram amplificadas, usando PCR, a partir de um vetor de clonagem padrão, pGem-5Zf (Promega), usando iniciadores que incluíssem uma seqüência Kozak ótima e sítios de restrição adequados para clonar os fragmentos nos vetores da região constant GS pCON γ 1f e PCON κ (Lonza).

Depois da amplificação, os fragmentos foram purificados e digeridos com as enzimas de restrição para a clonagem e ligados nos dois vetores. O fragmento variável de cadeia pesada foi digerido com Hind III e Bsi WI e ligado no vetor pCON γ 1f que foi digerido com Hind III e Bsi WI e desfosforilado com alcalino fosfatase. O fragmento variável de cadeia leve foi

digerido com Hind III e Apa I e ligado no vetor PCON κ que foi digerido com Hind III e Apa I e desfosforilado com alcalino fosfatase. Os vetores pCON γ 1f/variável-pesado e PCON κ /variável-leve são mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. as colônias *E. coli* transformadas foram checadas pela PCR de colônia e 2 colônias positivas de cada uma das construções de cadeia pesada (HC) e cadeia leve (LC) foram cultivadas para a isolamento de plasmídeo. O plasmídeo isolado destes 4 clones foi sequenciado para confirmar a sequência. Ambos dos clones HC e um dos clones LC foram descobertos ter as sequências corretas.

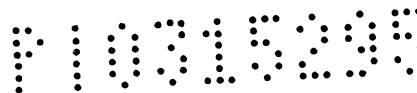
10 As duas construções HC e uma LC foram combinadas para dar duas combinações de LC-HC e transitoriamente co-transfectadas em células CHO-K1 para checar as construções quanto a produção apropriada de anticorpo 2F2. Os níveis de produção normais foram atingidos para todas as combinações neste experimento de expressão e 1 clone de cada uma das
15 construções HC e LC foram escolhidas para a construção de um vetor de gene duplo.

Os procedimentos de clonagem padrão foram usados para combinar as construções HC e LC em um vetor de clonagem de gene duplo, designado pCON γ 1f/ κ 2F2, pela ligação do cassete de expressão completo do
20 vetor de cadeia pesada, pCON γ 1f/variável-pesado, no vetor de cadeia leve, pCON κ /variável-leve. O vetor pCON γ 1f/ κ 2F2 é mostrado na Figura 3.

Esta construção foi mais uma vez funcionalmente testada em uma transfecção transitória em células CHO-K1 e apresentou níveis normais de expressão.

25 As regiões variáveis do plasmídeo pCON γ 1f/ κ 2F2 foram sequenciadas para reconfirmar as sequências corretas.

O plasmídeo linear foi preparado para transfecções estáveis pela digestão de pCON γ 1f/ κ 2F2 com uma enzima de restrição única, Pvu I, cortando fora das regiões vitais para a expressão. A linearização completa foi



confirmada pela eletroforese em gel de agarose e o DNA foi purificado e armazenado a -20°C até o uso.

Seis transfecções de células hospedeiras NS/0 foram realizadas, pela eletroporação com o DNA plasmídico, usando o plasmídeo de DNA linear acima. A seguir da transfecção, as células foram distribuídas em placas de 96 reservatórios e incubadas. Meio seletivo (contendo 10 % de soro de bezerro fetal dialisado (dFCS) e 10 μ M do inibidor GS L-metionina sulfoximina mas carecendo de glutamina) foi adicionado e as placas foram monitoradas para determinar quando as células não transfectadas morreram para deixar focos de células transfectadas. Para mais detalhes no que diz respeito a sistemas de vetor GS, ver a WO 87/04462. As placas transfectadas foram incubadas por aproximadamente três semanas para permitir a formação da colônia. As colônias resultantes foram examinadas microscopicamente para verificar que as colônias fossem de um tamanho adequado para o ensaio (cobrindo mais do que 60 % do fundo do reservatório) e que apenas uma colônia estava presente em cada reservatório. Os sobrenadantes de célula de 436 transfectantes foram triados quanto ao anticorpo montado pelo IgG, κ -ELISA. Usando estes dados, 111 transfectantes foram selecionados quanto a progressão e ainda avaliação em cultura estática. As culturas das linhagens de célula selecionadas foram expandidas e adaptadas para meio contendo baixo teor de soro (contendo albumina sérica bovina (BSA) e adicionado 1 % de dFCS) e uma outra avaliação de produtividade em cultura estática foi empreendida (ELISA e medição da confluência percentual). As 65 linhagens de célula de classificação mais alta foram selecionadas para a progressão. Uma avaliação preliminar da produtividade das linhagens de célula selecionadas foi feita em cultura de suspensão em frasco agitado em lote em meio contendo baixo teor de soro (contendo BSA e adicionado 1 % de dFCS). Com base na concentração de anticorpo colhido (pelo ELISA) e características de crescimento aceitáveis, 30 linhagens de célula foram



selecionadas para mais avaliação em meio isento de soro usando uma cultura de suspensão em frasco agitado em lote. As 10 linhagens de célula que produziram as concentrações de anticorpo mais altas foram ainda avaliadas em cultura de suspensão em frasco agitado em lote alimentado em duplicata em meio isento de soro. As concentrações de produto na colheita foram determinadas pela cromatografia líquida de alto desempenho em proteína A (HPLC), de acordo com métodos padrão bem conhecidos. Todas as linhagens de célula produziram anticorpo 2F2 (denotado 2F2T) em bons rendimentos na faixa de 671 a 1333 mg/L como determinado pela HPLC em proteína A.

10 11B8T: Em um modo similar uma linhagem de célula GS-NS/0 foi estabelecida para a produção recombinante de 11B8 (denotado 11B8T) modificando o procedimento de transfecção levemente como segue.

Quatro transfecções de células hospedeiras NS/0 foram realizadas, pela eletroporação com o DNA plasmídico, usando o plasmídeo de DNA linear acima. Depois de examinar as colônias resultantes microscopicamente para verificar que as colônias foram de um tamanho adequado para o ensaio (cobrindo mais do que 60 % do fundo do reservatório) e que apenas uma colônia estava presente em cada reservatório, os sobrenadantes de célula de 596 transfectantes foram triados quanto ao anticorpo montado pelo IgG, κ -ELISA. Usando estes dados, 100 transfectantes foram selecionados para a progressão e outra avaliação em cultura estática. As culturas das linhagens de célula selecionadas foram expandidas e adaptadas para meio contendo baixo teor de soro (contendo albumina sérica bovina (BSA) e adicionado 1 % de dFCS) e uma outra avaliação de produtividade em cultura estática foi empreendida (ELISA e medição de confluência percentual). As 60 linhagens de célula de classificação mais alta foram selecionadas para a progressão e um adicional de 13 linhagens de célula para as quais os dados de produtividade estavam indisponíveis também foram progredidas. Uma avaliação preliminar da produtividade das linhagens de

célula selecionadas foi feita em cultura de suspensão em frasco agitado em lote em meio contendo baixo teor de soro (contendo BSA e adicionado 1 % de dFCS). Com base na concentração de anticorpo colhido (por ELISA) e características de crescimento aceitáveis, 10 linhagens de célula foram selecionadas para outra avaliação em culturas de suspensão em frasco agitado em lote alimentado em duplicata em meio contendo baixo teor de soro (contendo BSA e adicionado 1 % de dFCS). As concentrações de produto na colheita foram determinadas pela cromatografia líquida de alto desempenho em proteína A (HPLC), de acordo com métodos padrão bem conhecidos. Com base nisto uma das linhagens de célula foi descartada. As 9 linhagens de célula resultantes todas produziram anticorpo 11B8 (denotado "11B8T") em bons rendimentos na faixa de 354 a 771 mg/L como determinado pela HPLC em proteína A.

Exemplo 4 Comparação de 2F2 derivado de hibridoma e 2F2T recombinante derivado de transfectoma

Pelo uso de eletroforese em gel (SDS-PAGE e eletroforese em gel de agarose nativa) foi mostrado que 2F2 e 2F2T são do mesmo tamanho e apenas levemente diferentes na carga elétrica.

Além disso, 2F2 e 2F2T se ligam a células NS/0 e células Raji transfectadas com CD20 com afinidade similar como medido pela citometria de fluxo usando FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). Nenhuma ligação às células NS/0 não transfectadas foi observada demonstrando a especificidade de 2F2 e 2F2T. 2F2 e 2F2T também induzem CDC em uma maneira dependente da concentração no mesmo grau em células ARH-77 (leucemia de célula plasmática IgG), células Daudi, células DOHH (linfoma de célula B imunoblástica refratária progredido de linfoma centroblástico/centrolítico folicular, DSMZ, Braunschweig, Alemanha) e células Raji, medindo a lise de célula (número de células positivas em PI) pela citometria de fluxo (FACScalibur). Em um segundo experimento, as

concentrações de 2F2 e 2F2T foram mantidas constantes enquanto soro foi adicionado em concentrações diferentes. Nenhuma diferença significativa entre 2F2 e 2F2T foram observadas.

Finalmente, 2F2 e 2F2T ligados à CD20 associada à célula se ligam ao fator de complemento C1q fortemente e no mesmo grau. O experimento foi realizado em células Daudi, células DOHH e células Raji usando anticorpos policlonais anti-C1q conjugados à fluoresceína para detectar a ligação de C1q.

Exemplo 5 Características de Ligação de Anticorpos Humanos Contra CD20

Ligação às linhagens de célula diferentes: As células NS/0, NS/0 transfectadas com CD20 humana, Daudi e Raji foram incubadas durante 30 min a 4°C com sobrenadante de cultura contendo anticorpos humanos 2F2, 7D8 e 11B8 seguido pela incubação com IgG Ab anti-humano conjugado com FITC. A ligação foi avaliada pela citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo FACScalibur. As intensidades de fluorescência foram comparadas com amostras igualadas com isótipo negativo de controle. Como mostrado na Figura 4, todos os três anticorpos ligaram-se às células NS/0 transfectadas com CD20 humana, ao passo que nenhuma ligação foi observada com as células NS/0 precursoras, não transfectadas. Todos os três anticorpos também se ligaram às duas linhagens de célula de linfoma B de Burkitt diferentes (Raji e Daudi) indicando que 2F2, 7D8 e 11B8 são específicos de CD20. O sobrenadante contendo 7D8 ou 11B8 foi testado sob condições não saturantes, portanto, intensidades de fluorescência média mais baixas comparadas com 2F2 são observadas.

O valor EC_{50} de 2F2 como determinado pela citometria de fluxo: De modo a determinar a afinidade aparente de 2F2 para CD20 expressada em células B humanas, uma curva de ligação foi feita de 2F2 usando PBMCs isoladas a partir de três doadores humanos e obstrução de

células negativas em CD3. As PBMCs isoladas foram incubadas durante 1 hora com uma faixa de concentração de 2F2 rotulado com FITC e analisada em FACS e a intensidade de fluorescência média (MFI) determinada. Os valores de MFI são mostrados nas figuras 5A e 5B como uma função da concentração de anticorpo. Os valores EC_{50} foram calculados pelo uso de Graph Pad Prism 3.02 pela regressão não linear. O valor EC_{50} de 2F2 em seres humanos foi similar para todos os três doadores com uma média ($\pm$ s.e.m.) de $287 \pm 12,7$ ng/ml ($1,9 \pm 0,1$ nM).

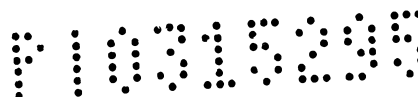
Ligação de mAbs rotulado com ^{125}I às células que expressam CD20: mAbs foram iodados usando Iodopérolas (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). mAbs rotulados com ^{125}I foram diluídos em série e incubados com células Ramos-EHRB durante 2 horas a $37^{\circ}C$ na presença de azida de sódio e 2-desoxiglicose para impedir a endocitose. A ligação de célula e mAbs rotulados com ^{125}I livres foram depois separados pela centrifugação a $14.000 \times g$ durante 2 min através de uma mistura de óleos de ftalato, permitindo a separação rápida sem perturbar o equilíbrio de ligação. As células pelotizadas juntas com o anticorpo ligado foram depois contadas usando um contador gama (Wallac UK Ltd, Milton Keynes, UK).

Como mostrado na Figura 6, 2F2 e 11B8 exibem K_D similares (ou pontos de saturação similares) indicando que ambos os anticorpos se ligam com afinidade similar. Entretanto, 11B8 satura a um nível mais baixo do que 2F2 indicando que ele reconheceu uma forma diferente de CD20. Isto também está de acordo com um outro experimento que mostra que um número similar de moléculas de anticorpo 2F2 e rituximab se ligam à CD20 nas células Ramos-EHRB e células Daudi, como mostrado pelos níveis similares de saturação de ligação (aproximadamente 2 a 3×10^5 moléculas de anticorpo por célula). 11B8 e B1, ao contrário, saturam na metade deste nível e apenas cerca de 1 a 2×10^5 moléculas de anticorpo se ligam às células Ramos-EHRB (Figura 7A) e células Daudi (Figura 7B).

Para excluir a possibilidade de que os anticorpos iodados se liguem por intermédio de receptores Fc, curvas de ligação foram confirmadas pelo uso de fragmentos $F(ab')_2$ anti-CD20. Mais uma vez, números similares de fragmentos 2F2 e rituximab- $F(ab')_2$ ligaram-se tanto às células Ramos-EHRB quanto às Daudi. Também nestes experimentos, o número de moléculas de anticorpo de 2F2 ou rituximab ligadas às células Ramos-EHRB e células Daudi satura em aproximadamente duas vezes o número de moléculas 11B8 e B1 ligadas às células.

● 10 Taxa de Dissociação: Para determinar a taxa de dissociação de mAbs, células Ramos-EHRB (volume final de 1 ml na presença de azida/2DOG) foram incubadas durante 2 horas a 37°C com 2 µg/ml de ^{125}I mAbs para se obter a ligação máxima. A seguir da centrifugação em uma microcentrífuga (2000 rpm durante 2 min), o sobrenadante foi removido, a
15 pelota rapidamente recolocada em suspensão em 1 ml de meio e imediatamente transferida para 9 ml de meio a 37°C em um tubo cônico de 15 ml. Em vários tempos durante as 2 horas seguintes, amostras de 0,4 ml foram removidas e separadas em óleos de ftalato para determinar o nível de mAbs radorrotuladas que permanece na superfície da célula. Como mostrado na
● 20 Figura 8, tanto 2F2 quanto 11B8 dissociaram significativamente mais lento da CD20 do que rituximab ou B1.

Taxas de dissociação de fragmentos $F(ab)_2$ anti-CD20: células Ramos-EHBR foram saturadas com 2 µg/ml de fragmentos $F(ab)_2$ rotulados com ^{125}I de 2F2, 11B8 e rituximab, respectivamente. As células Ramos-EHBR foram lavadas e incubadas na presença de uma alta concentração do
25 anticorpo não rotulado. A ligação máxima (inicial) às células Ramos-EHRB foi ajustada a 100 %. Em diversos pontos de tempo durante as 3 horas seguintes a seguir da carga, amostras de 0,4 ml foram removidas e separadas em óleo de ftalato para determinar os níveis de mAb radorrotulados que permanecem na superfície da célula. Como pode ser visto a partir da Figura 9,



2F2 e 11B8 dissociaram muito mais lentamente da superfície de CD20 do que rituximab. Em 90 min, aproximadamente 50 % das moléculas $F(ab)_2$ de rituximab foram ligadas à célula, ao passo que metade das moléculas $F(ab)_2$ 2F2 foram dissociadas depois de 3 horas. Os valores de k_d (k_{off}) para 2F2,

5 11B8T e rituximab são calculados como segue:

$$F(ab)_2 \text{ 2F2: } k_d = \ln 2/t_{1/2} \text{ (s)} = \ln 2/10800 \text{ (s)} = 6,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

$$F(ab)_2 \text{ 11B8T: } k_d = \ln 2/t_{1/2} \text{ (s)} = \ln 2/9000 \text{ (s)} = 7,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

$$F(ab)_2 \text{ rituximab: } k_d = \ln 2/t_{1/2} \text{ (s)} = \ln 2/5400 \text{ (s)} = 1,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Off rates funcional de mAb anti-CD20: O impacto da taxa de dissociação de 2F2 lenta comparada ao rituximab foi avaliado em um ensaio de CDC funcional. Para esta finalidade, células Daudi ou SU-DHL4 foram pré incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb anti-CD20 ou um anticorpo de controle isotípico, lavadas e incubadas em meio durante pontos de tempo diferentes. Nestes pontos de tempo depois do início do ensaio, amostras foram incubadas com complemento (soro humano normal 20 % vol/vol) e depois incubadas por mais 45 min a 37°C. Em seguida, a lise de célula foi determinada em FACS usando-se o método de tingimento com PI (iodeto de propídio). A % de células lisadas (células positivas em PI) é mostrada na Figura 10A (células Daudi) ou Figura 10B (células SU-DHL4) como uma função do tempo de incubação. 2F2 induziu alto CDC em ambas as linhagens de célula e ainda lisou até 90 % das células depois de 6 horas, indicando que a saturação com CD20 das células permaneceu suficientemente alta para induzir a lise mediada por complemento da maioria das células. Rituximab, ao contrário e de acordo com os estudos de taxa de dissociação acima, dissociou-se rapidamente das células e falhou em induzir a lise específica a seguir do período de incubação de 6 horas. 11B8 foi usado como um controle e não induziu CDC.

Exemplo 6 CDC de Anticorpos Humanos Contra CD20

25 Preparação de Soro: O soro para a lise de complemento foi preparado drenando-se sangue de voluntários saudáveis em tubos vacutainer



em gel autosep e ativador de coágulo (BD biosciences, Rutherford, NJ) que foram mantidos na temperatura ambiente durante 30 a 60 min e depois centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. O soro foi colhido e armazenado a -80°C.

5 Citometria de fluxo: Para a citometria de fluxo um citômetro de fluxo FACScalibur foi usado com software CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA). Pelo menos 5000 eventos foram coletados para a análise com fragmentos de célula excluídos pelo ajuste do patamar de dispersão para um lado avançada (FCS).

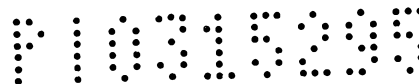
10 Cinéticas de CDC: Em um primeiro conjunto de experimentos (n = 3) as cinéticas de CDC de cinco linhagens de célula B diferentes, isto é, Daudi, SU-DHL-4, Raji, DOHH e ARH-77, foram determinadas adicionado-se 10 µg/ml de 2F2, rituximab e um anticorpo IgG de controle, respectivamente, durante 10 min antes que o soro humano fosse adicionado.

15 Em diversos intervalos de tempo (até uma hora) depois da indução de CDC, as células foram colocadas em suspensão em solução PI e a lise de célula (número de células positivas em PI) foi medida pela citometria de fluxo. Os resultados são representados nas Figuras 11A (células ARH-77), 11B (células Daudi), 11C (células Raji), 11D (DOHH) e 11E (SU-DHL-4). Como

20 observado, a adição de anticorpos induziu a lise de célula dentro de 5 min. De modo interessante, a adição de 2F2 resultou em uma lise de célula acentuada de mais do que 80 % em todas as cinco linhagens de célula B. Rituximab induziu mais do que 80 % de lise de célula apenas na linhagens de célula SU-DHL-4 e Daudi, ao passo que a lise de célula da linhagem de célula DOHH

25 foi ~50 % e menos do que 20 % nas linhagens de célula ARH-77 e Raji. Nenhuma lise foi observada com o anticorpo de controle de IgG (dados apenas mostrados na Figura 11B).

Titulação com soro CDC: Em um conjunto separado de experimentos (n = 5), NHS (soro humano normal) foi titulado em duas



concentrações de anticorpo diferentes de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 5 $\mu\text{g/ml}$. As células foram pré incubadas com 2F2 ou rituximab durante 10 min, antes uma faixa de concentração de NHS foi adicionada. Em 45 min depois da indução de CDC, as células foram recolocadas em suspensão em solução de PI. A lise de célula (número de células positivas em PI) foi medida pela citometria de fluxo. As Figuras 12A-D mostram a porcentagem de células lisadas (positivas em PI) como uma função da concentração de NHS. A Figura 12A mostra a lise de célula de células Daudi, a Figura 12B a lise de célula de células ARH-77, a Figura 12C a lise de célula de células DOHH e a Figura 12D a lise de célula de células Raji. A lise aumentada de células foi observada com a concentração de NHS aumentada. A adição de 2F2 causou a lise máxima de células Daudi na concentração de NHS e anticorpo mais alta. Rituximab induziu cerca de 50 % de lise de célula de células Daudi na concentração NHS mais alta.

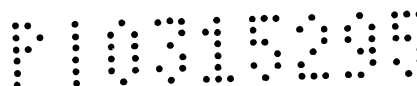
Em células ARH-77, apenas a concentração mais alta de NHS e 2F2 levou a aproximadamente 75 % de lise de célula. As concentrações de anticorpo mais baixas foram insuficientes para induzir a lise de célula ARH-77. Rituximab não foi capaz de induzir a lise de célula de células ARH-77 neste experimento.

2F2 foi capaz de induzir a lise de célula dependente da concentração de NHS de células DOHH tanto na concentração alta quanto na baixa, ao passo que rituximab não foi capaz de induzir a lise sob estas condições.

Finalmente, 2F2 induziu lise dependente da concentração de NHS de células Raji, que foi apenas aparente pelo uso de 5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb. Nenhuma lise foi observada com rituximab.

Nestes experimentos, nenhuma lise foi observada com o anticorpo de controle isotópico (dados não mostrados).

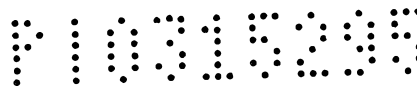
Titulação de anticorpo CDC: Para medir a capacidade dos



anticorpos anti-CD20 para induzir CDC em concentrações baixas, um experimento foi realizado onde os anticorpos foram titulados ($n = 6$). Várias linhagens de célula foram pré incubadas com uma faixa de concentração de 2F2 e rituximab, respectivamente, durante 10 min antes que NHS fosse adicionado. Depois de 45 min de incubação a 37°C (quando a lise máxima ocorre) as células foram recolocadas em suspensão em solução PI e a lise de célula (número de células positivas em PI) foi medida pela citometria de fluxo. As Figuras 13A (células Daudi), 13B (células DOHH), 13C (células ARH-77) e 13D (células Raji) mostram a porcentagem de células lisadas (positivas em PI) como uma função da concentração de anticorpo. Tanto 2F2 quanto rituximab induziram um aumento dependente da concentração na lise de célula. 2F2 induziu mais do que 80 % da lise de células Daudi na adição de 2 µg/ml, ao passo que com rituximab este nível não foi atingido mesmo depois da adição de 10 µg/ml. Além disso, 2F2 induziu mais do que 80 % de lise de células DOHH a 0,4 µg/ml, ao passo que a lise mínima foi observada com rituximab nesta concentração. A lise máxima de células DOHH com rituximab (~30 % de células analisadas totais) foi atingida a 10 µg/ml. A indução da lise de células ARH-77 e Raji pelo 2F2 foi mais baixa, mas ainda ~70 % de lise foi atingida a uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml. Na sua concentração mais alta, rituximab induziu a lise em apenas ~23 % de células ARH-77 e em apenas ~6 % de células Raji.

Em um experimento similar, 2F2, 2F2T, 11B8T e rituximab foram investigados quanto a sua capacidade para induzir CDC de linhagens de célula Daudi e Raji, ver as Figuras 14A e 14B. Também neste experimento mais do que 80 % de lise de células Daudi foi observado com (derivado de transfectoma) 2F2T a 10 µg/ml, ao passo que rituximab atingiu apenas 60 % de lise mesmo a 10 µg/ml, conforme a Figura 14A. A lise de células Daudi com 2F2T foi idêntica à lise obtida com derivado de hibridoma 2F2.

A lise de células Raji foi mais difícil, mas mais uma vez tanto



2F2 quanto 2F2T induziram a lise de células Raji a um grau similar (Figura 14B). Rituximab não foi capaz de induzir CDC de células Raji que está de acordo com o experimento mostrado na Figura 13D.

5 Como podem ser observado a partir das Figuras 14A e 14B nem as células Daudi nem as Raji foram suscetíveis a CDC pela 11B8T. B1 induziu a lise de células Daudi, mas apenas em um grau pequeno e não foi capaz de induzir a lise de células Raji.

10 Atividade CDC de anti-CD20 em células Daudi: Para determinar a atividade de CDC de cada anticorpo, a permeabilidade de membrana elevada foi avaliada usando a análise FACS de células tingidas com iodeto de propídio (PI). Em resumo, as células Daudi foram lavadas e recolocadas em suspensão em RPMI/1 % de BSA a 1×10^6 células/ml. Várias concentrações de anticorpos monoclonais humanos foram adicionadas às células Daudi e permitiu-se que se ligassem à CD20 nas células durante 10 a 15 min na temperatura ambiente. Em seguida, soro como uma fonte de complemento foi adicionado a uma concentração final de 20 % (v/v) e as misturas foram incubadas durante 45 min a 37°C. As células foram depois mantidas a 4°C até a análise. Cada amostra (150 µl) foi depois adicionada a 10 µl de solução PI (10 µg/ml em PBS) em um tubo FACS. A mistura foi imediatamente ensaiada pela citometria de fluxo. Como mostrado na Figura 15A, 2F2 e 7D8 apresentaram atividade CDC superior comparada ao rituximab.

25 Em um segundo experimento, as células foram rotuladas com anticorpos monoclonais humanos como acima, depois lavadas e incubadas em PBS durante 45 min a 37°C antes da adição de soro humano. Isto garantiu que apenas anticorpo ligado à célula no momento da adição de soro estivesse disponível para ativar complemento para a lise de célula. Como mostrado na Figura 15B, a atividade de CDC diminuída foi encontrada para rituximab comparada com 2F2 e 7D8 indicando que os anticorpos humanos (2F2 e 7D8)

não são afetados pela lavagem das células antes da adição de soro.

Atividade CDC de anti-CD20 em células Raji: A atividade de CDC foi avaliado usando células Raji que têm expressão de superfície relativamente alto de CD55 e CD59 e, portanto, são mais resistentes ao ataque de complemento. Anticorpos humanos foram adicionados às células Raji e permitidas ligar-se durante 15 min. Soro humano (20 %) foi adicionado e as misturas incubadas durante 45 min a 37°C. Como mostrado na Figura 16A, rituximab foi ineficaz em mediar CDC de células Raji ao passo que níveis significantes de lise de célula ocorreram nas células Raji opsonizadas com 2F2 ou 7D8. Conseqüentemente, 2F2 e 7D8 têm uma capacidade única para lisar células alvos positivas em CD55/59.

Em um experimento separado, as células Raji foram pré incubadas com concentrações saturantes de anti-CD55 mAb (concentração final de 5 µg/ml) e anti-CD59 mAb (concentração final de 5 µg/ml) para bloquear os efeitos destas moléculas de defesa de complemento. Anticorpos anti-CD20 humanos foram depois adicionados junto com soro (20 %) como acima durante 45 min a 37°C. Como mostrado na Figura 16B, o bloqueio de moléculas CD55 e CD59 resultou em quase 100 % de lise de células Raji com anticorpos humanos 2F2 ou 7D8 ao passo que apenas um aumento de 25 % na lise de célula foi observada usando rituximab.

Papel de inibidores de complemento I – Expressão de moléculas de superfície: Visto que os inibidores de complemento tais como CD55 e CD59 parecem desempenhar um papel importante na suscetibilidade ao CDC induzido por rituximab, um experimento foi realizado para determinar a expressão destas moléculas nas linhagens de célula B sob investigação (Raji, Daudi, DOHH, ARH-77 e SU-DHL-4).

As células foram tingidas com anticorpos anti-CD55, anti-CD59 e anti-CD20 conjugados com FITC e a expressão das moléculas foram analisadas pela citometria de fluxo. Os resultados são mostrados na Tabela 1

abaixo.

Tabela 1

Expressão	CD20	CD55	CD59
ARH-77	++	++++	++
Raji	+	++	+++
DOHH	++	+++	++
SU-DHL-4	+++	+	++
Daudi	++	+	+

Papel de inibidores de complemento II – Bloqueio de CD55 e

CD59: Para estudar ainda mais os papéis de CD55 e CD59 em CDC induzido

5 por anti-CD20, ambas as moléculas inibidoras de complemento foram bloqueadas pelos anticorpos específicos antes da indução de CDC ($n = 3$). As células Raji foram usadas porque apenas a lise parcial foi induzida pela 2F2 sozinha. As células Raji (1×10^5 células/50 μ l) foram pré incubadas com uma faixa de concentração de 2F2 e rituximab junto com anticorpos anti-CD55 (5 μ g/ml) ou anti-CD59 (5 μ g/ml) durante 10 min, antes que NHS reunida (20 %) fosse adicionada. Em 45 min depois da indução de CDC, as células foram recolocadas em suspensão em solução de PI. A lise de célula (número de células positivas em PI) foi medida pela citometria de fluxo. As Figuras 17A-C mostram a porcentagem de células lisadas (positivo em PI) como uma

10 função da concentração de anticorpo e mostram um experimento que é exemplar de três experimentos. A Figura 17A mostra a incubação de células Raji com anticorpo anti-CD55, a Figura 17B a incubação de células Raji com anticorpo anti-CD59 e a Figura 17C a incubação de células Raji com anticorpos anti-CD55 e anti-CD59.

15

20 Como pode ser observado na Figura 17A, a adição de anticorpo anti-CD55 não influencia a CDC induzida por 2F2 ou rituximab. A adição de anticorpo anti-CD59 aumentou a susceptibilidade das células tanto ao 2F2 quanto ao rituximab com ~30 % (Figura 17B). A adição tanto de anti-CD55 quanto anti-CD59 ainda realçou a lise induzida pelo anti-CD20 de

25 células com ~30 % (Figura 17C).

Papel de fatores de complemento, como determinado pela

citometria de fluxo I –ligação de C1q: Anticorpos anti-CD20 (2F2 e rituximab) e um anticorpo de controle isotópico foram adicionados às várias linhagens de célula B. Depois de 10 min de incubação, NHS (1 % vol/vol) foi adicionado. Depois de outra incubação durante 10 min a 37°C e lavagem das células, o sobrenadante foi descartado e a pelota de célula foi incubada com anticorpo anti-C1q conjugado com FITC. Os dados mostram a intensidade de fluorescência média de células tingidas com C1q e são representados nas Figuras 18A (Daudi), 18B (ARH-77), 18C (DOHH) e 18D (Raji) (n = 6). Os resultados indicaram aumento dependente da concentração de anticorpo na ligação de C1q pelo 2F2, independente da linhagem de célula B investigada. Além disso, a ligação de C1q por 2F2 foi sempre mais alta do que a ligação por rituximab, em todas as linhagens de célula testadas. Nenhum aumento na fluorescência média foi observado com o anticorpo de controle isotópico (dados não mostrados).

Papel de fatores de complemento, como determinado pela citometria de fluxo II – Ativação de complemento por intermédio da via clássica: A fixação de C4c às células revestidas com anticorpo é uma indicação da ativação de complemento por intermédio da via clássica. Anticorpos anti-CD20 (2F2 e rituximab) e um anticorpo de controle isotópico foram adicionados às várias linhagens de célula B. Depois de 10 min de incubação a 37°C, NHS (1 % vol/vol) foi adicionado. Depois de mais incubação e lavagem das células, o sobrenadante foi descartado e a pelota de célula foi incubada com anticorpo anti-C4c conjugado com FITC. Os dados mostram a intensidade de fluorescência média de células tingidas com C4c e são representados nas Figuras 19A (Daudi), 19B (ARH-77), 19C (DOHH) e 19D (Raji) (n = 6). A fixação do fator de complemento C4c ao 2F2 foi demonstrada em todas as linhagens de célula B testadas (n = 3), com um máximo atingido a ~1 µg/ml de anticorpo. A fixação de C4c depois ligação de 2F2 foram muito mais altas do que depois de rituximab, independente da

linhagem de célula testada. Nenhum aumento na fluorescência média foi observada com o anticorpo de controle isotípico (dados não mostrados).

5 CDC no soro inativado por calor: As células (células Daudi, células ARH-77 ou células Raji) e os anticorpos (rituximab, 2F2, 2F2T, 11B8 e anticorpo de controle isotípico HuMab-KLH IgG1) foram pré incubados em uma faixa de concentração de anticorpos anti-CD20 durante 10 min, antes que NHS (ativada ou inativada por calor em um banho de água a 57°C em 30 min) fosse adicionada. Em 45 min depois da indução de CDC, as células foram recolocadas em suspensão em solução de PI. A lise de célula (número de
10 células positivas em PI) foi medida pela citometria de fluxo. Nenhuma lise das células foi observada na presença de soro inativado por calor, independente da linhagem de célula e anticorpo CD20 usados, nenhuma CDC foi observada na presença de soro inativado por calor.

15 **Exemplo 7 ADCC de Anticorpos Humanos Contra CD20 Ensaio de ADCC I**

Enriquecimento de neutrófilos humanos: As células polimorfonucleares (neutrófilos, PMNs) foram enriquecidas a partir de sangue integral heparinizado. O sangue foi diluído duas vezes em RPMI 1640 e foi
20 disposto em camada em Ficoll (Meio de Separação de Linfócito 1077 g/ml, 710 g, temperatura ambiente, 20 min; BioWhittaker, cat. 17-829E, lote nº 0148 32) e centrifugados a 2000 rpm durante 20 min. A camada de célula mononuclear foi removida e os eritrócitos dentro da pelota contendo neutrófilos foram hipotonicamente lisados usando solução de NH₄Cl gelada (155 mM de NH₄Cl, 10 mM de NaHCO₃, 0,1 mM de EDTA, pH 7,4). Os
25 neutrófilos remanescentes foram lavados duas vezes e recolocados em suspensão em RPMI 1640 suplementado com 10 % de FCS (RPMI-10).

Enriquecimento de células mononucleares de sangue periférico humano: O sangue humano foi diluído duas vezes em RPMI 1640 e as células sanguíneas foram dispostas em camadas em Ficoll (Meio de Separação de



Linfócito 1077 g/ml, 710 g, temperatura ambiente, 20 min; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Bélgica, cat. 17-829E, lote nº 0148 32). As células mononucleares de sangue periférico (MNCs) foram coletadas da interfase, lavadas e recolocadas em suspensão em meio de cultura RPMI 5 1640 suplementado com 10 % de FCS, 2 mM de L-glutamina, 5 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina (todos derivados da BioWhittaker) ao qual 25 mM de HEPES (BioWhittaker) foram adicionados.

Ajuste de ADCC: Células B alvo (células B recém isoladas ou das linhagens de célula B) foram rotuladas com 20 µCi de ⁵¹Cr (Amersham 10 Biosciences, Uppsala, Suécia) durante 2 horas. Depois de lavagem extensiva em RPMI-10, as células foram ajustadas para 1×10^5 células/ml. O sangue integral ou células efetoras isoladas (50 µl; MNCs, PMNs) ou plasma (50 µl), anticorpos sensibilizantes (50 µl) e RPMI-10 (50 µl) foram adicionados às placas de microtítulo de fundo redondo (Greiner Bio-One GmbH, 15 Frickenhausen, Alemanha). Os ensaios foram iniciados adicionando-se células alvo (50 µl) dando um volume final de 200 µl. Para as células efetoras isoladas, uma relação de efetor para alvo (E:T) de 40:1 foi usada. Para o sangue integral, uma quantidade de 33 % vol/vol foi usada correspondente a uma relação de efetor para alvo estimada de 40:1. Depois da incubação (3 20 horas, 37°C), os ensaios foram interrompidos pela centrifugação e a liberação de ⁵¹Cr de triplicatas foi medida em contagens por minuto (cpm) em um contador de cintilação. A porcentagem de citotoxicidade celular foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de lise específica} = (\text{cpm experimental} - \text{com basal}) / (\text{com máxima} - \text{com basal}) \times 100$$

com a liberação de ⁵¹Cr máxima determinada pela adição de 25 ácido perclórico (concentração final de 3 %) para alvejar células e a liberação basal medida na ausência de anticorpos sensibilizantes e células efetoras.

Estatísticas: Os dados foram analisados por ANOVA de via



única, seguido pelo teste *post-hoc* de multi comparação de Tukey. A análise foi realizada usando Graph Pad Prism (versão 3.02 para Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

5 Lise de células ARH-77: Em um primeiro conjunto de experimentos, células ARH-77 foram usadas como células alvo (Figura 20). A
adição de 2F2 ($n = 3$), rituximab ($n = 3$) ou 11B8T ($n = 1$) resultou na lise
mediada por MNC de células ARH-77 de aproximadamente 50 %. Nenhuma
lise específica foi observada na presença de neutrófilos. A adição de plasma
10 (para avaliar o papel de complemento) induziu a lise de células ARH-77
depois da incubação com 2F2, mas não depois da incubação com rituximab (p
 < 0.05 , 2F2 vs. nenhum anticorpo, ANOVA) ou 11B8T. Na presença de
sangue integral, a lise de células ARH-77 aumentou depois da incubação com
2F2 ($p < 0.05$, 2F2 vs. rituximab e 2F2 vs. nenhum anticorpo, ANOVA), mas
não com rituximab. A lise específica induzida pelo rituximab foi de fato
15 muito baixa na presença de sangue integral. 11B8T induziu a lise de célula de
aproximadamente 25 % ($n = 1$) na presença de sangue integral. Na ausência
de anticorpo, a lise não específica de 10 a 15 % foi observada.

Lise de células B-CLL: Em um segundo conjunto de
experimentos, as células da leucemia linfocítica B crônica (B-CLL) obtidas de
20 pacientes B-CLL ($n = 12$) foram subclonadas durante 5 rodadas e depois
usadas como células alvo no experimento (Figura 21). Na ausência de
anticorpo, nenhuma lise específica foi observada, mas a adição de 2F2,
11B8T ou rituximab (10 $\mu\text{g/ml}$) aumentou a lise específica mediada por MNC
em 10 a 20 % ($p < 0.001$, ANOVA). A incubação de células alvo com plasma
25 e 2F2 induziram a lise específica de células B-CLL, ao passo que nenhuma
lise específica foi observada com 11B8T ou rituximab ($p < 0.001$, ANOVA).
Além disso, 2F2 mediou a lise específica de células B-CLL depois da
incubação em sangue integral. Nenhuma lise específica de células B-CLL
pelo sangue integral foi observada com 11B8T ($p < 0.01$, ANOVA) ou

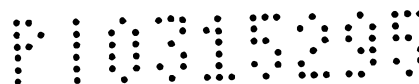
rituximab ($p < 0,001$, ANOVA). Nenhuma lise específica foi observada na presença de neutrófilos.

Porque rituximab foi capaz de mediar ADCC eficazes mas não CDC das células de tumor testadas, é provável que a lise de célula B induzida no sangue integral pelo 2F2 seja mediada por intermédio de complemento.

Lise de células de leucemia de célula pilosa (HCL): Em um terceiro conjunto de experimentos a lise de células HCL pelo 2F2, 11B8T e rituximab pelo ADCC ou na presença de plasma ou sangue integral foi determinada. Os dados são mostrados na Figura 22. Ao passo que os neutrófilos não puderam mediar ADCC independente do mAb usado, 11B8T foi capaz de induzir a lise mediada por MNC de células HCL mais eficientemente do que 2F2 ($p < 0,001$, ANOVA) ou rituximab ($p < 0,05$, ANOVA). 2F2 e rituximab não foram capazes de induzir a lise mediada por MNC de células HCL. A lise mediada pelo plasma das células foi fortemente realçada com 2F2, quando comparada ao rituximab ($p < 0,05$, ANOVA), 11B8T ($p < 0,01$, ANOVA) ou sem anticorpo ($p < 0,001$, ANOVA). Quando a lise induzida pelo anti-CD20 na presença de sangue integral foi estudada, 2F2 induziu a lise completa de células e foi superior ao rituximab ($p < 0,01$, ANOVA), 11B8T ou nenhum anticorpo adicionado ($p < 0,001$, ANOVA).

Lise de células B-ALL: Usando células de dois pacientes a capacidade de 2F2 e rituximab para induzir a lise de células B-ALL por ADCC ou complemento foi investigada (Figura 23). Como foi observado nos experimentos anteriores, 2F2 e rituximab induziram a ADCC mediada por MNC de células B-ALL a um grau similar. Mas novamente 2F2 foi capaz de induzir a lise mediada pelo plasma e sangue integral de células B-ALL, ao passo que rituximab não foi.

Lise de células de linfoma folicular: Quando a lise de células de linfoma folicular ($n = 2$) foi investigada, um quadro diferente surgiu (Figura 24). Uma lise mediada por PMN de células com 2F2 foi observada e



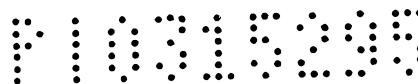
tanto 2F2 quanto rituximab não foram capazes de induzir a ADCC mediada por MNC. 11B8T foi ainda capaz de induzir a lise mediada por MNC em aproximadamente 20 %. Embora uma lise mediada por plasma relativamente alta fosse induzida por rituximab, a lise mediada por plasma completa foi observada com 2F2. Também com sangue integral, a lise completa foi observada com 2F2, ao passo que 70 % da lise com rituximab. A lise medida por plasma ou sangue integral mínima pelo 11B8T foi observada.

Lise de células de linfoma de célula de manto primária: a lise específica de células de linfoma de célula de manto foi mais difícil de induzir (n = 1, Figura 25). A lise mínima ou nenhuma lise pelo 2F2, 11B8T ou rituximab foi observada depois da adição de PMN ou MNC e CD20 mAbs. Entretanto, 2F2 foi ainda capaz de induzir aproximadamente 40 % de lise pelo plasma ou sangue integral, ao passo que com rituximab apenas 10 a 20 % das células foram lisadas. 11B8T não foi capaz de induzir a lise de células de linfoma de célula de manto primária.

Lise dependente da concentração de anticorpo de células ARH-77 em sangue integral: Em um outro experimento (n = 4) a dependência da dose com respeito à indução de ADCC em células ARH-77 na presença de sangue integral foi analisada. Como pode ser observado na Figura 26, a titulação de 2F2 induziu um aumento dependente da dose na porcentagem de lise específica (p < 0,05: efeito de tratamento, ANOVA de duas vias) de células ARH-77. Nenhuma lise específica de células ARH-77 foi observada com rituximab.

Ensaio ADCC II

Preparação de células alvo rotuladas com ^{51}Cr : Células ARH-77 e células Raji foram coletadas (3×10^6 células) em RPMI++, giradas (1500 rpm; 5 min), recolocadas em suspensão em 140 μl de ^{51}Cr (Cromo 51; CJS11-1mCi, lote 12; 140 μl são cerca de 100 μCi) e incubadas (37°C banho de água; 1 hora). Depois de lavar as células (1500 rpm, 5 min, em PBS, 3x), as



células foram recolocadas em suspensão em RPMI++ e contadas pela exclusão em azul de tripano. As células foram levadas até a concentração de 2×10^4 células/ml.

Preparação de células efetoras: Células mononucleares de sangue periférico fresco (MNC) foram isolados a partir de 40 ml de sangue heparina pela Ficoll (Bio Whittaker; meio de separação de linfócito, cat 17-829E) por intermédio das instruções do fabricante. Depois da recolocação em suspensão de células em RPMI++, as células foram contadas pela exclusão em azul de tripano e ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/ml.

Ajuste de ADCC: 50 μ l de RPMI++ foram pipetados em placas de 96 reservatórios e 50 μ l de células alvo rotuladas com ^{51}Cr foram adicionadas. Em seguida, 50 μ l de anticorpo foram adicionados, diluídos em RPMI++ (concentrações finais 10, 1, 0,1, 0,01 $\mu\text{g/ml}$). As células foram incubadas (temperatura ambiente, 10 min) e 50 μ l de células efetoras foram adicionadas, resultando em uma relação de efetor para alvo de 50:1 (para a determinação de lise máxima, 50 μ l de Triton-X-100 a 5 % foram adicionados ao invés de células efetoras). As células foram giradas (500 rpm, 5 min) e incubadas (37 °C, 5 % de CO_2 , 4 horas). Depois de girar as células (1500 rpm, 5 min), 100 μ l de sobrenadante foram colhidos em tubos *micronic* e contados em um contador gama. A porcentagem de lise específica foi calculada como segue:

$$\% \text{ de lise específica} = (\text{cpm amostra} - \text{cpm de células alvo apenas}) / (\text{cpm de lise máxima} - \text{cpm de células alvo apenas}) \times 100$$

Estatísticas: Dados foram analisados por ANOVA de via única, seguido pelo teste de *post-hoc* de multi comparação de Tukey. A análise foi realizada usando Graph Pad Prism (versão 3.02 para Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Lise dependente da concentração de anticorpo de células ARH-77 e Raji: 2F2T e 11B8T foram testados quanto a sua capacidade para

induzir ADCC de células ARH-77 e Raji ($n = 3$) em comparação com rituximab.

Uma relação dose-efeito com CD20 mAbs foi observada na ADCC de células ARH-77 usando MNC como células efectoras (Figura 27).

5 Tanto 2F2T quanto 11B8T induziram a lise específica de células ARH-77 que foi máxima (50 %) a 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb. Rituximab induziu apenas 25 % da lise de células alvo. A adição do anticorpo de controle isotípico (HuMab-KLH) não induziu ADCC. Nenhuma lise específica foi observada sem a adição de MNCs (dados não mostrados).

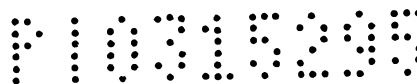
10 Quando as células Raji foram usadas como células alvo, um quadro similar como com células ARH-77 surgiu (Figura 28). Tanto 2F2T quanto 11B8T induziram a lise mediada por MNC de células Raji, se bem que 2F2T pareceu mais potente do que 11B8T em concentrações baixas. A lise máxima atingida com 2F2T e 11B8T foi de aproximadamente 35 %.

15 Rituximab induziu a lise mediada pelo MNC de células Raji, embora apenas 20 % das células alvo fossem suscetíveis ao rituximab. A adição do anticorpo de controle isotípico (HuMab-KLH) não induziu ADCC. Nenhuma lise específica foi observada sem a adição de MNCs (dados não mostrados).

Exemplo 8 Análise da insolubilidade em FRET e Triton-X

20 Preparação de mAb conjugado a Cy3 e Cy5 para a transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET): Anticorpos monoclonais foram diretamente conjugados aos derivados de éster NHS bifuncionais de Cy3 e Cy5 (Amserham Biosciences UK Ltd) como descrito nas instruções do fabricante. Em resumo, mAb foi dialisado contra tampão de

25 carbonato/bicarbonato 0,1 M (pH 9). Em seguida, o corante foi dissolvido em H_2O , imediatamente adicionado a 1 mg do mAb e incubados na temperatura ambiente no escuro durante 45 min. Os mAbs rotulados foram separados do corante não conjugado pela cromatografia em gel usando uma coluna PD10-Sephadex G25 equilibrada em PBS. As relações molares de ligação foram



determinadas espectrofotometricamente de $\epsilon_{552} = 150/\text{mM}/\text{cm}$ para Cy3, $\epsilon_{650} = 250/\text{mM}/\text{cm}$ para Cy5 e $\epsilon_{280} = 170/\text{mM}/\text{cm}$ para proteína e variou de 5 a 8 vezes de excesso corante:proteína.

5 Análise FRET: Células Daudi foram recolocadas em suspensão a 5×10^6 células/ml em PBS/0,1 % de BSA e mAb conjugado a (Cy3) doador e conjugado a (Cy5) aceitador equimolar foram combinados e adicionados à suspensão de célula (concentração final $10 \mu\text{g}/\text{ml}$). As células foram incubadas durante 30 min no escuro, a 4°C ou 37°C . Cada experimento incluiu células rotuladas com mAb conjugado a doador e aceitador depois da pré incubação com um excesso molar de 20 vezes de mAb não conjugado e células rotuladas com mAb conjugado a doador e aceitador na presença de mAb não rotulado equimolar. Para avaliar a associação de antígenos rotulados, a medição de FRET citométrico de fluxo foi realizada usando um FACScalibur (BD Biosciences). As intensidades de fluorescência a 585 nm 10 (FL2) e 650 nm (FL3), ambas excitaram a 488 nm e as intensidades de fluorescência a 661 nm (FL4), excitado a 635 nm, foram detectadas e usadas para calcular FRET de acordo com a equitação abaixo, onde A é aceitador (Cy5) e D é doador (Cy3). Todos os valores obtidos foram corrigidos quanto a autofluorescência usando a seguinte fórmula:

$$\text{FRET} = \frac{\text{FL3(D,A)} - \text{FL2(D,A)}}{\text{a} - \text{FL4(D,A)}} / \text{b}$$

20 onde $\text{a} = \text{FL2(D)}/\text{FL3(D)}$ e $\text{b} = \text{FL4(A)}/\text{FL3(A)}$

Os parâmetros de correção foram obtidos usando dados coletados de células rotuladas únicas e a dispersão de luz de ângulo lateral foi usada para excluir fragmentos e células mortas. FRET entre derivados de mAb doador e aceitador em células duplamente rotuladas é expressado em 25 termos de emissão sensibilizada de aceitador a 488 nm. valores de FRET maiores indicam associação física mais próxima dos anticorpos rotulados com doador e aceitador ou uma densidade mais alta de mAb rotulado com aceitador na proximidade de mAb rotulado com doador.

Avaliação de antígeno associado a balsa pela insolubilidade em Triton X-100 (TX): Como uma avaliação rápida da presença de antígeno nos microdomínios de balsa, um método de citometria de fluxo com base na insolubilidade em Triton X-100 (TX) em temperaturas baixas foi usado, como descrito anteriormente. Em resumo, as células Daudi foram lavadas em RPMI/ 1 % de BSA e recolocadas em suspensão a $2,5 \times 10^6$ /ml. As células (100 μ l) foram depois incubadas com 10 μ g/ml de mAb conjugado a FITC durante 15 min a 37°C, lavadas em PBS frio/ 1 % de BSA/ 20 mM de azida de sódio (PBS-BS) e a amostra foi dividida ao meio. Todas as amostras foram mantidas em gelo por todo o resto do ensaio. Uma metade foi mantida em gelo para permitir o cálculo de níveis de 100 % de antígeno de superfície, enquanto a outra foi tratada com 0,5 % de TX durante 15 min em gelo para determinar a proporção de antígenos que permanecem na fração balsa insolúvel. As células foram depois mantidas a 4°C por todo o resto do ensaio, lavadas uma vez em PBS-BS, recolocadas em suspensão em PBS-BS e ensaiadas pela citometria de fluxo. Para determinar o nível constitutivo de associação de balsa dos antígenos alvos, as células foram primeiro tratadas com 0,5 % de TX durante 15 min em gelo e lavadas em PBS-BS antes da ligação de mAb rotulado com FITC.

Como mostrado nas figuras 29A, 29B e 29C, a análise de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) indica a formação de cacho de CD20 na incubação com 2F2 ou 7D8. Nenhuma de tal formação de cacho foi observada na incubação com 11B8. Estes resultados são compatíveis com os dados de tratamento TX, conforme a Figura 29C, (isto é, 2F2 e 7D8, diferentes de 11B8 permanecem com a fração insolúvel da célula a seguir da ligação) e sustentam o conceito de que 2F2 e 7D8, na ligação, translocam CD20 em compartimento de balsa lipídica da membrana celular B.

Como mostrado na Figura 30 (valores FRET e s.e.m. de três

experimentos usando ANOVA de via única seguido pelo teste de post-hoc de multi comparação de Tukey) a análise FRET indica a formação de cacho de rituximab e 2F2, ao passo que nenhuma formação de cacho foi observada com 11B8T. Estes dados estão de acordo com os dados obtidos depois do tratamento com 0,5 % de TX antes da ligação de mAbs rotulado com FITC como mostrado na Figura 31 (n = 2).

Preparação de frações de balsa lipídica e Western blotting: Um outro modo de examinar a associação de CD20 com balsas lipídicas, é investigar a distribuição de CD20 entre as frações de membrana de balsa e não balsa usando o método de fracionamento em gradiente de sacarose como divulgado por Deans, J. P., *et al.*, J. Biol. Chem., 1998. 273(1): pp 344 a 348, exceto que Optiprep (Sigma) foi usado ao invés de sacarose. Anticorpos monoclonais direcionados contra CD20 (10 µg/ml) foram permitidos ligar-se às células Daudi (1×10^7) durante 20 min a 37 °C. A seguir desta incubação, as células foram pelotizadas, lavadas duas vezes com PBS e lisadas em tampão de lise gelado (1,0 % de TX em solução salina tamponada com MES (25 mM de MES, pH 6,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila, 5 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml de leupeptina, 10 mM de EDTA)). A pelota de célula foi recolocada em suspensão completamente e incubada durante 20 min em gelo. Depois disso, o lisado foi misturado com 400 µl de Optiprep a 60 % frio (Sigma). A amostra foi disposta em camadas com uma etapa de 600 µl de cada 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 0 % de Optiprep em tampão de lise. Os gradientes foram girados a 40.000 rpm a 4°C durante 18 horas. Seis frações do topo foram coletadas, resolvidas em um gel de 4 a 15 % de SDS-PAGE, transferidas em membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo primário (polissoros anti-CD20 de camundongo; Serotec, UK), seguido pelo anticorpo secundário conjugado a HRP (anti camundongo de coelho-HRP; Jackson, Bar Harbor, Maine, USA). As manchas foram visualizadas usando substrato de duração prolongada Supersignal West Dura

(Pierce, Woburn, MA, USA).

Os resultados são mostrados na Figura 32. Como podem ser observado, moléculas CD20 são confinadas à fração de alta densidade 5 (células não tratadas). As células tratadas com rituximab apresentaram uma mudança distinta na distribuição de CD20 com uma proporção significant nas frações de membrana de densidade mais baixa 2 e 3, coincidentes com a fração onde as balsas de membrana são esperadas sedimentar. As células tratadas com 2F2 também apresentaram esta mudança das frações 2 e 3. Ao contrário, as células tratadas com 11B8T durante 20 min apresentaram uma distribuição similar às células não tratadas, com moléculas CD20 na fração 5. Em conclusão, a ligação a 2F2 e rituximab induz uma mudança de moléculas CD20 até as frações de membrana de densidade mais baixa, ao passo que a ligação a 11B8T não.

Exemplo 9 Apoptose de Linhagens de Célula de Burkitt com Anticorpos Humanos Contra CD20

Apoptose: Células Daudi, $0,5 \times 10^6$ em 1 ml de meio de cultura de tecido, foram plaqueadas em placas de fundo chato de 24 reservatórios com 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb ou anticorpos de controle e incubadas a 37°C. Depois de 20 horas, as células foram colhidas, lavadas em tampão de ligação Annexin-V-FITC (BD biosciences) e rotuladas com Annexin V-FITC (BD biosciences) durante 15 min no escuro a 4°C. As células foram mantidas a 4°C até a análise. Cada amostra (150 μl) foi adicionada a 10 μl de solução de PI (10 $\mu\text{g/ml}$ em PBS) em um tubo de FACS. A mistura foi imediatamente ensaiada pela citometria de fluxo usando um citômetro de fluxo FACScalibur com o software CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA). Pelo menos 10.000 eventos foram coletados para a análise.

Indução de apoptose em células Daudi: As células Daudi foram incubadas durante 20 horas na presença de anticorpos humanos contra

CD20 (1 $\mu\text{g/ml}$) (sem a adição de um anticorpo de reticulação secundário). A indução de apoptose foi avaliada pelo tingimento com AnnexinV/PI usando a citometria de fluxo.

5 Como mostrados nas figuras 33A-G, 11B8 mostra evidência clara de induzir a apoptose (similar àquela induzida por um anticorpo anti-IgM). 2F2 e 7D8 não induz a apoptose de células Daudi. Um anticorpo anti-CD20 de camundongo que induz a apoptose, AT80, foi usado como um controle.

10 Indução de apoptose em células Raji: A indução de apoptose de células Raji foi testada com uma faixa de concentração de CD20 mAbs. A Figura 34 mostra a porcentagem de células annexin-V-positivas. Como pode ser observado a partir da Figura 34, mAb anti-CD20 humana de camundongo de controle positivo, B1, induziu um aumento dependente da concentração na apoptose de células Raji com um máximo de aproximadamente 70 % a 10
15 $\mu\text{g/ml}$ de mAb. Também 11B8 foi um indutor forte da apoptose, resultando na apoptose de células Raji com um máximo de 53,4 % a 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb. Por outro lado, 2F2 e rituximab foram muito deficientes em induzir a apoptose de células Raji, com níveis levemente elevados de apoptose comparado aos níveis de controle negativo.

20 Indução de apoptose em células Daudi: O mesmo quadro surgiu quando células Daudi foram usadas como células alvo, depois da adição de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de CD20 mAb (Figuras 35A e 35B). Os dados na Figura 35A mostram o total de células positivas em annexin-V e os dados na Figura 35B (o eixo X mostrando annexin-V e o eixo Y mostrando PI) mostram as
25 porcentagens de células Daudi na apoptose inicial (annexin-V positiva e PI negativo) e apoptose final (annexin-V positiva e PI positivo). Mais uma vez, tanto B1 (65,9 %) quanto 11B8T (56,3 %) foram indutores fortes da apoptose (Figura 36), quando usados a uma concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$. A adição de 2F2T resultou em um baixo nível de células Daudi apoptóticas (17 %). A

adição de rituximab resultou em aproximadamente 29 % de apoptose de células Daudi. A adição de anticorpo de controle isotípico HuMab-KLH não induz a apoptose de células Daudi (6 %).

Exemplo 10 Adesão Homotípica de Células com Anticorpos Humanos Contra CD20

A agregação homotípica correlaciona-se com a indução de apoptose. Portanto, a capacidade do mAbs anti-CD20 para induzir a agregação homotípica de células B foi investigada.

Agregação homotípica de células Ramos-EHRB: Células Ramos-EHRB ($0,5 \times 10^6$ em 1 ml de meio de cultura de tecido) foram incubadas a 37°C durante 4 horas na presença de anticorpos anti-CD20 11B8, 2F2 ou 7D8 (sem reticulação) e a indução da adesão homotípica foi avaliada pela microscopia ótica (como descrito acima).

Como mostrado nas figuras 36A-E, 11B8 causou a agregação extensiva de células Ramos-EHRB (similar à agregação causada pelo anticorpo de murino anti-CD20, AT80). 2F2 e 7D8 não induzem a agregação homotípica de células Ramos.

Agregação homotípica de células Daudi: As células Daudi foram colocadas em placas de fundo chato de 24 reservatórios com 1 ou 10 µg/ml de mAbs anti-CD20 ou anticorpo de controle e incubados a 37°C durante 4 horas. O grau de agregação homotípica foi determinado pela microscopia ótica. Como pode ser observado a partir da Figura 37, 2F2 a agregação homotípica dificilmente induzida de células Daudi, com 1,0 µg/ml (e 10 µg/ml, dados não mostrados). Rituximab deu pouca agregação homotípica de células Daudi. Ao contrário, o anticorpo B1 foi um indutor forte da agregação homotípica.

Exemplo 11 Imunoterapia Usando Anticorpos Humanos Contra CD20

Terapia com alta dose (100 µg) de 2F2 e 7D8 de camundongos SCID inoculados com células Daudi: Os camundongos SCID foram obtidos



da Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK e cruzados e mantidos sob condições livres de patógeno. As células Daudi ($2,5 \times 10^6$) foram injetadas i.v. na veia da cauda de grupos de camundongos SCID de 12 a 16 semanas de idade, seguidas 7 dias mais tarde pela injeção de 100 μ g de 2F2 ou 7D8 por intermédio da mesma via. Os animais foram sacrificados na apresentação de paralisia de membro, de acordo com as instruções do *animal ethics committee*. Como mostrado na Figura 38, a sobrevivência dos camundongos é prolongada depois do tratamento com 2F2 ou 7D8.

Terapia com alta dose (100 μ g) de 2F2 e rituximab de camundongos SCID inoculados com células de Tanoue: As células de Tanoue ($2,5 \times 10^6$ em 200 μ l de PBS) foram injetados i.v. na veia da cauda de grupos de camundongos SCID de 12 a 16 semanas de idade (Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK) seguida 7 dias mais tarde pela injeção de 100 μ g (em 200 μ l de PBS) de mAb anti-CD20 por intermédio da mesma via. Neste experimento, 2F2 foi comparado ao rituximab e B1. Os animais foram sacrificados na apresentação de paralisia do membro traseiro. Os resultados são mostrados na Figura 39. No dia 39, os primeiros dois camundongos de controle morreram e a morte dentro deste grupo foi completa no dia 54. Apenas um camundongo morreu dentro deste intervalo de tempo a seguir do tratamento com 2F2 e a sobrevivência foi consideravelmente aumentada para os outros camundongos neste grupo. Um camundongo morreu 81 dias a seguir da injeção das células de tumor e os camundongos remanescentes (60 % do número total) sobreviveram além do término do experimento a 100 dias após a inoculação do tumor. Rituximab ao contrário apenas aumentou a sobrevivência em 2 dos 5 camundongos (morrendo em 66 e 83 dias após a inoculação) e nenhum dos camundongos sobreviveram até o final do experimento. No grupo B1, a sobrevivência de camundongos SCID foi similar àquela no grupo 2F2, com dois camundongos morrendo no dia 48 e um camundongo no dia 76. Neste grupo, quarenta por cento foram vivos no

momento em que o experimento foi terminado.

Resposta de dose de tratamento com 2F2 e rituximab de camundongos SCID inoculados com células Daudi: Para avaliar a eficácia de 2F2 em comparação ao rituximab na proteção contra tumorigênese, uma titulação de dose foi realizada na terapia de camundongos SCID inoculados com células Daudi de tumor. As células Daudi expressam mais CD20 do que as células Tanoue e são mais sensíveis à morte *in vitro*. 10 grupos de camundongos SCID (4 por grupo) e 1 grupo de controle (5 camundongos SCID) foram injetados com $2,5 \times 10^6$ células Daudi (em 200 μ l PBS) i.v. no dia 0 e depois tratados com 20, 5, 2, 0,5 ou 0,1 μ g (em 200 μ l PBS) rituximab, 2F2 ou PBS (controle) i.v. no dia 7. Os animais foram sacrificados na apresentação de paralisia de membro traseiro. Os resultados são mostrados na Figura 40.

No grupo de controle, todos os camundongos morreram dentro do intervalo de tempo de 26 a 29 dias. Entretanto, uma relação de dose-efeito evidente foi observada com 2F2 (Figura 40, gráfico superior). Ao passo que nenhum efeito foi observado com doses de 0,1 μ g e 0,5 μ g de 2F2, tão pouco quanto 2 μ g de 2F2 substancialmente prolongou a sobrevivência até o dia 41, 5 μ g de 2F2 prolongou a sobrevivência até o dia 47 e 20 μ g de 2F2 prolongou a sobrevivência mesmo até o dia 50.

Ao contrário, rituximab mesmo testado na dose mais alta de 20 μ g apenas aumentou levemente a sobrevivência e nenhuma relação de dose-efeito foi portanto observada nas concentrações mais baixas testadas (Figura 40, gráfico inferior).

Terapia de camundongos SCID com tumores de Daudi pelo 11B8T e B1: células Daudi ($2,5 \times 10^6$) em 200 μ l de PBS foram injetadas i.v. na veia da cauda de grupos de camundongos SCID de 12 a 16 semanas de idade, seguido 7 dias mais tarde pela injeção de 100 μ g de 11B8 ou B1 em 200 μ l de PBS por intermédio da mesma via. Os animais foram sacrificados

na apresentação de paralisia de membro traseiro. Em camundongos de controle tratados com PBS, todos os camundongos morreram dentro de um intervalo de tempo de 35 a 53 dias (Figura 41). O tratamento com 11B8T fortemente protegeu os camundongos, com camundongos morrendo entre 72 e 98 dias após a inoculação do tumor. No grupo de tratamento B1, a maioria dos camundongos sobreviveram até o dia 98 e 40 % dos camundongos sobreviveram além do final do experimento, isto é, dia 100.

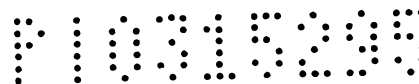
Exemplo 12 Avaliação de anticorpos anti-CD20 em um modelo de xenoenxerto Daudi-luc usando camundongos SCID

10 A eficácia terapêutica de anticorpos anti-CD20 foi avaliada em um modelo de camundongo em que a consequência disseminada de células de tumor de célula B humana é seguido usando a produção de imagem externa. Neste modelo as células de tumor são transfectadas com luciferase de vagalume. Na administração de luciferina (Molecular Probes, Leiden, Países

15 Baixos) aos camundongos as células rotuladas podem ser detectadas *in vivo* pela produção de imagem bioluminescente usando uma câmara CCD altamente sensível, conforme Wetterwald *et al.* (2002) American Journal of Pathology, 160(3):1143-1153.

20 As células Daudi foram transfectadas com gWIZ luciferase da Gene Therapy Systems (San Diego, CA) e cultivadas em RPMI com 10 % de FCS, Pen/Strep, Piruvato de Sódio e 1 ug/ml de puromicina (Sigma). As células foram analisadas quanto a expressão da luciferase (expressada em RLU/ 1×10^5 células) em um luminômetro e quanto a expressão de CD20 pelo FACS. $2,5 \times 10^6$ células Daudi transfectadas com luciferase/camundongo

25 foram injetados i.v. em camundongos SCID. Oito dias depois da inoculação, os camundongos receberam um tratamento de dose única (10 μ g) de 2F2T, 11B8T, rituximab, B1 ou anticorpo de controle isotípico (huIgG1) (grupo de 6 camundongos por tratamento). Para a produção de imagem, os camundongos foram anestesiados pela injeção i.p. de uma mistura de cetamina /xilazina



/atropina. D-Luciferina sintética (sal de sódio, Molecular Probes) foi dada i.p. a uma dose de 25 mg/ml. Os camundongos foram depois colocados em uma caixa de luz apertada e depois de 3 min, a produção de imagem foi iniciada usando um detector de CCD resfriado com nitrogênio líquido VersArray 1300B (Roper Scientific). Os fótons emitidos a partir da luciferase foram contados em um período de exposição de 5 min. Sob retro iluminação e imagens brancas foram feitas por referência. O software MetaVue (Universal Imaging Corp) foi usado para a coleta de dados e análise de imagem. A significância estatística de diferenças entre grupos foi estabelecida usando a análise de via única de variação com um pós teste de Newman-Keuls usando GraphPad PRISM versão 3.02 (Graphpad Software Inc).

A produção de imagem do lado traseiro foi realizada em intervalos de uma semana. No dia 8, o dia de tratamento, a emissão de luz foi apenas detectada nos locais de inoculação na cauda. A formação de tumor em locais distantes foi detectada no dia 14 em todos os camundongos do grupo de controle de isótipo (huIgG1) e em um camundongo do grupo do rituximab. Nas semanas seguintes a emissão de luz aumentou uniformemente. A Figura 42 dá as imagens de todos os camundongos feitas no dia 39 (31 dias depois do tratamento), em que a bioluminescência é representada na cor vermelha (as áreas escuras nos camundongos) (intensidade de luz > 50 fótons por 5 min) como sobreposto na imagem de corpo em preto e branco dos camundongos. A massa tumoral em cada camundongo foi quantificada nos dias 25, 32, 39 e 46 integrando-se os sinais de luz em relação à superfície corporal, conforme a Figura 43. O crescimento de tumor mais rápido foi observado no grupo de controle de isótipo. O tratamento com rituximab deu inibição significativa do crescimento de tumor. Entretanto, a inibição de crescimento do tumor pelo 2F2T, 11B8T e B1 foi significativamente mais potente (ver abaixo a Tabela 2 quanto aos níveis de significância).

Tabela 2

**Níveis de Significância de diferenças na intensidade de luz integrada
entre grupos em diferentes pontos de tempo**

	Dia 25	Dia 32	Dia 39	Dia 46
B1 vs. rituximab	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,001
B1 vs. 11B8T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
B1 vs. 2F2T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
B1 vs. huIgG1	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	
rituximab vs. 11B8T	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,001
rituximab vs. 2F2T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,001
rituximab vs. huIgG1	P < 0,001	P > 0,05	P < 0,05	
11B8T vs. 2F2T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
11B8T vs. huIgG1	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	
2F2T vs. huIgG1	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,01	

Exemplo 13 Estudo Piloto e de Farmacocinética em macacos cinomolgos

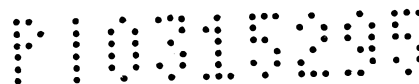
- 5 O objetivo foi determinar o padrão de farmacocinética padrão e efeitos farmacológica de 2F2 em macacos cinomolgos (aproximadamente 2 anos de idade; faixa de peso de 2,1 a 2,6 kg) a seguir das administrações de infusão intravenosa uma vez ao dia (por intermédio da veia safena) durante 4 dias consecutivos. O estudo também comparou os efeitos farmacológicos de
- 10 rituximab de modo a determinar o seu potencial equivalente. Para este propósito, 6 macacos cinomolgos machos e 6 fêmeas foram designados aos 6 grupos de dose que receberam 2F2 ou rituximab em níveis de dose de 1,25, 6,25 e 12,5 mg/kg/dia a um volume de dose constante de 10 ml/kg durante 4 dias consecutivos, no total 5, 25 e 50 mg/kg, respectivamente. Na conclusão
- 15 da administração da última dose, os animais foram retidos para um período de observação pós dose de 130 dias. As práticas e procedimentos adotados durante este estudo foram compatíveis com os princípios OECD Principles of Good Laboratory Practice como apresentado pelo United Kingdom Department of Health. Todos os animais foram observados em intervalos
- 20 regulares quanto aos sinais de má saúde ou reação ao tratamento e foram submetidos a uma examinação física. As investigações laboratoriais de hematologia, coagulação, química clínica e análise de urina foram realizadas durante o estudo. As amostras de sangue e as biópsias de linfônodos foram

obtidas (a partir dos linfônodos superficiais) para a análise de citometria de fluxo por todo o período de dosagem e observação pós dose. Os seguintes fenótipos de célula foram analisados pela citometria de fluxo: CD3, CD4, CD8, CD20 e CD21. Na conclusão do período de observação pós dose os animais foram sacrificados e submetidos a uma necrópsia detalhada.

Não houve nenhum sinal clínico adverso ou qualquer descoberta que fosse considerada estar relacionada com o tratamento com 2F2 ou rituximab. As Figuras 44 e 45 mostram a análise de citometria de fluxo de células que expressam CD20 e CD21 no sangue periférico de animais tratados, respectivamente. A Figura 46 mostra a análise de citometria de fluxo de células que expressam CD20 em linfônodos. Juntos, ambos os fenótipos analisados durante o estudo indicam um esgotamento forte e eficiente de célula B depois da administração de 2F2 e rituximab a 6,25 mg/kg/dia (25 mg/kg no total) e 12,5 mg/kg/dia (50 mg/kg no total). Além disso, os dados mostram que a repopulação de células que expressam CD20 nos linfônodos e sangue periférico de animais tratados com 2F2 reiniciou aproximadamente no dia 75 após a dosagem de 25 mg/kg e 50 mg/kg, isto é, acentuadamente mais tarde do que nos animais tratados com rituximab.

Além disso, as Figuras 47A-C mostram a análise citométrica de fluxo de subpopulações de célula que expressam $CD20^{baixo}CD23^{+}CD40^{alto}$ no sangue periférico (Y. Vugmeyster *et al.* (2003) *Citometry* 52A: 101 a 109).

As células de sangue periférico obtidas de macacos tratados com 2F2 ou rituximab em níveis de dose de 1,25 mg/kg (Figura 47A), 6,25 mg/kg (Figura 47B) e 12,5 mg/kg (Figura 47C) uma vez ao dia pelas administrações de infusão intravenosa durante 4 dias consecutivos foram incubadas com anticorpo monoclonal de murino FITC anti-CD20 humana (Coulter) na temperatura ambiente durante 10 min. Depois disso, as pérolas contadas foram adicionadas junto com PBS e as células foram lavadas duas vezes (300 g durante 10 min), seguido pela análise imediata da subpopulação



de célula que expressa $CD20^{baixo}CD23^{+}CD40^{alto}$ vs. $CD20^{alto}CD23^{+}CD40^{baixo}$ em um citômetro de fluxo (Beckman Coulter). Os resultados de células $CD20^{baixo}CD23^{+}CD40^{alto}$ mostrados são expressados como células por μl . Como podem ser observado a partir da Figura 47, 2F2 foi capaz de induzir um

5 esgotamento completo e mais longo de células que expressam $CD20^{baixo}CD23^{+}CD40^{alto}$ comparado ao rituximab.

Exemplo 14 Mapeamento de epítipo usando mutagênese direcionada ao sítio

Os estudos de mapeamento de epítipo usando um método de

10 mutagênese indicaram que a alanina na posição 170 (A170) e a prolina na posição 172 (P172) na segunda alça extracelular são críticos para o reconhecimento de CD20 humana pelos anticorpos anti-CD20 conhecidos. Nos estudos por Deans e colegas (M. J. Poliak, *et al.*, Blood, (2002) 99(9): pp 3256 a 3262; M. J. Poliak, *et al.*, J. Immunol., (1998) 161(7): pp 3242 a

15 3248) a ligação de todos mAbs anti-CD20 testados foi abolida mudando-se A170 e P172 nos resíduos S170 e S172 de CD20 de murino correspondentes. Alguma heterogeneidade no reconhecimento do epítipo AxP foi reconhecida entretanto visto que a maioria dos anticorpos como rituximab reconhecem CD20 de murino com S170 e S172 mutados para a seqüência A170xP172

20 humana ao passo que alguns outros requerem mutações adicionais imediatamente ao terminal N da seqüência AxP. Para verificar se o motivo A170xP172 também é importante para a ligação dos anticorpos de acordo com a invenção a seqüência AxP foi mutada em SxS usando a mutagênese direcionada ao sítio (mutante AxP = A170S, P172S), as células foram

25 transfectadas com o DNA de CD20 mutante AxP e do tipo selvagem (WT) e as ligações características do mAbs anti-CD20 foram comparados.

Outros mutantes foram preparados, P172S (prolina na posição 172 mutada para serina), N166D (asparagina na posição 166 mutada para ácido aspártico) e N163D (asparagina na posição 163 mutada para ácido



aspártico), usando a mutagênese direcionada ao sítio para avaliar se os resíduos de aminoácido mutados são importantes para a ligação dos anticorpos da invenção.

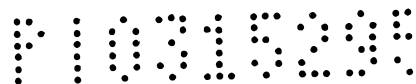
5 Para examinar isto, um vetor de expressão CD20 foi
construído amplificando-se a sequência codificadora CD20 usando
iniciadores adequados para introduzir sítios de restrição e uma sequência
Kozak ideal para a expressão ótima. Os fragmentos amplificado foi digerido e
ligado no vetor de expressão pEE13.4. Depois a transformação na *E. coli*, as
colônias foram triadas quanto aos insertos e dois clones foram selecionados
10 para o sequenciamento para confirmar a sequência correta. A construção foi
denominada pEE13.4CD20HS.

A mutagênese foi realizada para introduzir a mutação AxP e
para introduzir 20 mutações de camundongo nas regiões de alça extracelular
de CD20 humanas. A mutagênese foi checada pela digestão com enzima de
15 restrição e sequenciamento. As construções foram transitoriamente
transfectadas em células CHO (quanto a mutações AxP) ou células HEK293F
e analisadas 24 ou 48 horas após a transfecção usando citometria de fluxo.

Iniciadores de PCR de Oligonucleotídeo: Iniciadores de
oligonucleotídeo foram sintetizados e quantificados por Isogen BV
20 (Maarssen, Países Baixos). Os iniciadores foram reconstituídos em água em
uma concentração de 100 pmol/ μ l e armazenados a -20°C até requeridos. Um
resumo de iniciadores de PCR e sequenciamento é mostrado na Tabela 3.

Determinação da densidade ótica de ácidos nucleicos: A
densidade ótica foi determinada usando um Ultrospec 2100 pro Classic
25 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) de acordo com as instruções do
fabricante. A concentração de DNA foi medida pela análise da OD_{260nm}, onde
uma unidade OD_{260nm} = 50 μ g/ml. A solução de referência foi idêntica à
solução usada para dissolver os ácidos nucleicos.

Isolação de DNA plasmídico a partir da cultura de *E. coli*: O



DNA plasmídico foi isolado a partir de culturas de *E. coli* usando kits da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante (Westburg BV, Leusden, Países Baixos). Para a preparação de plasmídeo 'volumosa' um kit Hi-Speed plasmid Maxi ou um kit Hi-Speed plasmid Midi foram usados (Qiagen). Para uma preparação de plasmídeo em escala pequena (isto é, 2 ml de cultura de *E. coli*) um Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) foi usado e o DNA eluído em 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM).

Amplificação pela PCR: As reações de PCR foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante para a Pfu-Turbo® Hotstart DNA polimerase (Stratagene, Amsterdam, Países Baixos). Cada 20 µl de reação contiveram 1 x tampão de reação de PCR, 200 µM de dNTPs misturadas, 6,7 pmol de cada iniciador avançado e reverso, aproximadamente 1 ng de DNA padrão e 1 unidade de Pfu-Turbo® Hotstart DNA polimerase. As reações de PCR foram realizadas em um Thermociclor 96 de gradiente T (Biometra GmbH, Goettingen, Alemanha) usando um programa de 30 ciclos de: +95°C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de: +95°C durante 30 s, recozimento: um gradiente de 45 a 65°C durante 30 s e extensão: +72°C durante 2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 10 min a 72°C e armazenagem subsequente a 4°C. As reações completadas foram analisadas pela eletroforese em gel de agarose.

Eletroforese em gel de agarose: A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com Sambrook (Molecular Cloning Laboratory Manual, 3ª edição) usando géis de 50 ml, em tampão 1 x Tris/ácido acético/EDTA (TAE). O DNA foi visualizado pela inclusão de brometo de etídio no gel e observação sob luz UV. As imagens foram registradas por uma câmera CCD e um sistema de análise de imagem (GeneGnome; Syngene, Cambridge, UK).

Digestões com enzima de restrição: As enzimas de restrição foram fornecidas pela New England Biolabs (Beverly, MA) e usadas de



acordo com as recomendações do fornecedor. No geral, 100 ng foram digeridos com 5 unidades de enzima(s) em tampão apropriado em um volume final de 10 µl. Os volumes de reação foram classificados como apropriado. As digestões foram incubadas por um mínimo de 60 min na temperatura recomendada pelo fabricante.

Para os fragmentos que requerem digestões duplas com enzimas de restrição que têm exigências de tampão ou temperatura incompatíveis, as digestões foram realizadas sequencialmente de modo a oferecer condições favoráveis para cada enzima em ordem seguida.

10 Tratamento com alcalino fosfatase: Alcalino fosfatase de camarão (USB, Cleveland, OH) foi usada de acordo com as recomendações do fornecedor. A alcalino fosfatase remove grupos 5'-fosfato das extremidades de fragmentos de DNA prevenindo deste modo a auto-ligação. Isto é de relevância particular quando a auto re-ligação de um fragmento de DNA pode resultar em um vetor competente de replicação. A enzima é ativa na maioria dos tampões de enzima de restrição e foi adicionado como apropriado. Depois da digestão, a enzima foi inativada elevando-se a temperatura para 70°C durante 15 min.

20 Purificação de PCR e produtos de reação de enzima de restrição: A purificação foi realizada usando o kit de purificação por PCR mini-elute (fornecido pela Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as amostras de DNA foram diluídas em 5 volumes de tampão de ligação I (Qiagen) e carregado em uma coluna mini-elute dentro de um tubo de centrífuga Eppendorf. A montagem foi centrifugada em uma microcentrífuga de bancada. A coluna foi lavada duas vezes com tampão II (Qiagen): A seguir da aplicação do tampão, a montagem foi centrifugada e o fluxo atravessante foi descartado. A coluna foi secada pela centrifugação na ausência de tampão adicionado. O DNA foi eluído pela adição de tampão de eluição à coluna e o eluído coletado pela centrifugação. O DNA isolado foi



quantificado pela espectroscopia de UV e a qualidade avaliada pela eletroforese em gel de agarose.

Isolação de fragmentos de DNA a partir do gel de agarose: Onde apropriado (isto é, quando fragmentos múltiplos estavam presentes), as amostras de DNA digeridas foram separadas pela eletroforese em gel e o fragmento desejado excisado a partir do gel e recuperado usando o kit de extração em gel QIAEX II (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as faixas de DNA foram excisadas a partir do gel de agarose e fundidas em um tampão apropriado a +55°C. A resina QIAEX II foi adicionada e incubada durante 5 min. A resina QIAEX II foi pelotizada por uma etapa de centrifugação curta (1 min, 14000 g, temperatura ambiente) e lavada duas vezes com 500 µl de tampão de lavagem PE. A pelota final foi secada em uma capela e o DNA foi eluído com o volume apropriado de TE e temperature (dependendo do tamanho do DNA).

Ligação de fragmentos de DNA: As ligações foram realizadas com o Kit Quick Ligation (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada ligação, o DNA vetorial foi misturado com excesso molar de aproximadamente 3 vezes de DNA de inserto tal que a quantidade total de DNA foi mais baixa do que 200 ng em 10 µl, com volume ajustado com água como apropriado. Para isto foram adicionados 10 µl de 2 x Tampão Quick Ligation e 1 µl de Quick T4 DNA ligase e a mistura de ligação foi incubada durante 5 a 30 min na temperatura ambiente.

Transformação de DNA em bactérias: As amostras de DNA foram usadas para transformar as células de *E. coli* competentes em One Shot DH5α-T1R (Invitrogen, Breda, Países Baixos) usando o método do choque térmico de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 1 a 5 µl de solução de DNA (tipicamente 2 µl de mistura de ligação de DNA) foram adicionados a uma alíquota de células bacterianas competentes em transformação e a mistura incubada em gelo durante 30 min. As células foram

depois submetidas ao choque térmico transferindo-as a um banho de água a 42°C durante 30 s seguido por uma outra incubação em gelo durante 5 min. As células foram deixadas recuperar pela incubação em um meio de cultura não seletivo (SOC) durante 1 hora com agitação a 37°C e foram subsequentemente espalhadas sobre placas de ágar contendo agente seletivo apropriado (ampicilina a 50 µg/ml). As placas foram incubadas durante 16 a 18 horas a +37°C ou até que as colônias de bactérias tornaram-se evidentes.

Triagem de colônias bacterianas pela PCR: As colônias bacterianas foram triadas quanto a presença de vetores contendo as seqüências desejadas usando a técnica de triagem de colônia por PCR. 20 µl de mistura de reação de PCR contendo 0,5 volumes de HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 4 pmol dos iniciadores avançado e reverso e completada com água foram adicionados a um tubo de PCR. Uma colônia foi levemente tocada com uma ponta de pipeta de 20 µl, uma vez tocada em 2 ml de LB em um tubo de cultura (para cultivar as bactérias contendo o plasmídeo correspondente) e recolocadas em suspensão nos 20 µl de mistura de PCR. A PCR foi realizada em um Thermociclor 96 de gradiente T (Biometra) usando um programa de 35 ciclos de: +95°C durante 15 min, seguido por 35 ciclos de: +94°C durante 30 s, recozimento: 55°C durante 30 s e extensão: +72°C durante 2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 10 min a 72°C e armazenagem subsequente a 4°C. As reações completadas foram analisadas pela eletroforese em gel de agarose. Ver a Tabela 3 para detalhes de pares de iniciador usados para a PCR de colônia.

Seqüenciamento de DNA: As amostras de DNA plasmídico foram enviadas para AGOWA (Berlin, Alemanha) para a análise de seqüência. As seqüências foram analisadas usando o pacote de software VektorNTI (Informax, Frederick, MD, USA).

Tabela 3

Nome	Aplicação	Comprimento	Seqüência de Oligo
CD20P172S	Mutagênese de CD20	36	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTT CACAGTTGTA
CD20N166D	Mutagênese de CD20	39	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
CD20N163D	Mutagênese de CD20	36	AATCATGGACATACTTAATATTA
cd20exfor	Construção de CD20	41	TATAGCCCGGGGCCGCCACCATGACAACACC CAGAAATTCA
cd20exrev	Construção de CD20	38	GCGTCTCATGTACATTAAGGAGAGCTGTCATT TTCTAT
pee13.4seqrev2	PCR de colônia	23	TCGGACATCTCATGACTTTCTTT
pConKseq1	PCR de colônia	23	GTAAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
cd20hsapmutr (AxP)	Mutagênese de CD20	42	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTT CACAGTTGTA
cd20hsapmutf (AxP)	Mutagênese de CD20	42	TACAACTGTGAACCATCGAATTCCTCTGAGAA AAACTCCCCA
CD20seq2	Seqüenciamento de CD20	23	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
cd20seq1	Seqüenciamento de CD20	23	AATCATGGACATACTTAATATTA

Mutagênese: A mutagênese foi realizada, usando o kit de mutagênese direcionada a sítio QuikChange® XL (Cat 200517-5, Lote 1120630, Stratagene Europe) de acordo com as instruções do fabricante.

5 As reações de mutagênese foram concentradas usando precipitação com etanol e transformadas nas células de *E. coli* competentes em *oneshot* DH5 α -T1R ou submetidas à eletroporação em Células Competentes em Eletroporação ElectroTen-Blue®. As colônias foram checadas pela PCR de colônia e digestão de restrição antes da transfecção.

10 Transfecção de célula HEK293F: As células HEK293F foram obtidas da Invitrogen e transfectadas de acordo com as instruções do fabricante, usando 293fectin. As células HEK293F foram usadas para todas as seqüências mutantes únicas.

15 Transfecção de célula CHO: As células CHO cultivadas a aproximadamente 95 % de confluência foram transitoriamente transfectadas com CD20 do tipo selvagem, cDNA mutante ou uma combinação de ambas as construções usando lipofectamina 2000 (M668-019, Invitrogen, Breda, Países Baixos). Para esta finalidade, 24 μ g de DNA precipitado foram diluídos (1 μ g/ μ l) em 500 μ l de Optimem, em relações de AxP 100 % : WT 0
20 %; AxP 33,3 % : WT 66,6 %; AxP 66,6 % : WT 33,3 %; AxP 0 % : WT 100

%. Para cada transfecção 24 µl de lipofectamina foi diluída em 500 µl de Optimem. Depois, a lipofectamina diluída foi incubada (temperatura ambiente, 5 min) e o DNA diluído combinado com a lipofectamina diluída. Depois de misturar suavemente e incubar a solução (temperatura ambiente, 20 min), 1000 µl de DNA/lipofectamina foram adicionados às células CHO, completamente misturados e incubados durante 48 horas a 37°C, 5 % CO₂. Dois dias depois da transfecção de células CHO, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS (PBS suplementado com 0,1 % de BSA e 0,002 % de NaN₃). As células CHO foram tratadas com tripsina/EDTA (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escócia) e levantadas das placas de cultura.

Ligação de anticorpo anti-CD20: As células HEK293F e as células CHO foram absorvidas em PBS em uma concentração de 2×10^6 /ml e adicionadas às placas de fundo redondo (1×10^5 /reservatório). Depois, 50 µl de mAb CD20 foram adicionados, em diluições seriadas de 10, 5, 2,5 ou 0 µg por reservatório (4°C, 30 min). Depois de lavar em tampão FACS (PBS suplementado com 0,1 % de BSA e 0,002 % de NaN₃), as células foram analisadas em um citômetro de fluxo (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) e 5.000 eventos por amostra foram adquiridos em taxa de fluxo alta.

Como pode ser observado a partir das Figuras 48A-E, todos os mAbs anti-CD20 ligaram-se eficientemente às células CHO que expressam CD20 WT. Como esperado, rituximab não se ligou ao mutante AxP (Figura 48A) e B1 ligou-se a este mutante de modo deficiente (Figura 48D). Tanto 2F2 quanto 11B8 ao contrário ligaram-se a CD20 WT e AxP mutante igualmente bem (Figura 48B e Figura 48C). Titulando-se a quantidade de CD20 WT na superfície de fato titulou-se a ligação de rituximab e B1. Tanto 2F2 quanto 11B8 mais uma vez foram insensíveis à ausência ou presença da mutação.

Este estudo indica que a ligação de 2F2 e 11B8 para as CD20

humanas é insensível às mutações nas posições de aminoácido 170 e 172. 2F2 e 11B8 portanto representam uma nova classe de mAbs de CD20 que reconhecem um novo epítopo de CD20.

5 A Figura 49A mostra a ligação percentual de 2F2, 11B8T, B1 ou rituximab ao P172S mutante vs. CD20 WT, a Figura 49B mostra a ligação percentual de 2F2T, 11B8T, B1, CAT (CAT 13.6E12, um anticorpo IgG2A monoclonal de camundongo anti-CD20, Diatec. Com), um anticorpo isotípico de controle (KLH) ou rituximab à CD20 mutante (AxP) vs. CD20 WT.

10 Para o mutante em que a asparagina na posição 166 foi substituída com ácido aspártico (CD20N166D) 2F2 mostrou ligação muito baixa, ao passo que B1, rituximab e 11B8T foram capazes de se ligar, ver a Figura 49C. Em um experimento similar CAT 13.6E12 e rituximab foram capazes de se ligar a CD20N166D, ao passo que 2F2T apenas apresentou ligação muito baixa, ver a Figura 49D. Para o mutante em que asparagina na
15 posição 163 foi substituída pelo ácido aspártico (CD20N163D) mais uma vez rituximab, 11B8T e B1 foram capazes de se ligar a CD20N163D, ao passo que 2F2 e 2F2T apenas apresentaram ligação muito baixa, ver a Figura 49E. Em um experimento similar CAT 13.6E12 e rituximab foram capazes de se ligar a CD20N163D, ao passo que 2F2T apenas apresentaram ligação muito
20 baixa, ver a Figura 49F.

Estes experimentos indicam que 2F2 e 11B8 se ligam a epítopos diferentes.

Exemplo 15 Mapeamento de epítopo usando o método Pepscan

25 Síntese de peptídeos: Peptídeos de 7-, 9- e 15-mer foram sintetizados de acordo com métodos padrão. Em alguns casos a ligação química das pernas de um peptídeo de 15-mer ajuda a identificar as seqüências de aminoácido de um epítopo potencialmente descontínuo. De acordo com os procedimentos conhecidos (H. M. Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3998; J. W. Sloodstra *et al.* (1996) Mol. Divers. 1:

- 87; e WO 01/60769), peptídeos de 7-, 9- e 15-mer foram sintetizados o que pode ser possível ligando-se sítios ou epítomos envolvidos na ligação de 2F2 ou 11B8 à molécula de CD20 humana. Os de 9- e 15-mers foram sintetizados como alças e triados usando cartões mini-PEPSCAN no formato de cartões de crédito (455 formatos de peptídeo/cartão). Em todos os peptídeos em alça os aminoácidos nas posições variadas foram substituídos por uma cisteína (por exemplo, acetil-XCXXXXXXXXXXCX-minicartão). Os peptídeos foram sintetizados usando a química Fmoc padrão e desprotegido usando TFA com descontaminantes. Subsequentemente, os peptídeos desprotegidos foram reagidos na microssérie com uma solução 0,5 mM de 1,3-bis(bromometil)-benzeno em bicarbonato de amônio (20 mM, pH 7,9), suplementado com acetonitrila (1:1 (v/v)). As microsséries foram suavemente agitadas na solução durante 30 a 60 min, enquanto completamente coberto na solução. Finalmente, as microsséries foram lavadas extensivamente com excesso de Millipore H₂O e sonificadas em tampão de rompimento contendo 1 % de dodecilsulfato de sódio, 0,1 % β -mercaptoetanol, em PBS (pH 7,2) a 70°C durante 30 min, seguido pela sonificação em millipore H₂O por mais 45 min. Subsequentemente, os microrreservatórios estavam prontos para a triagem em um ensaio de ELISA.
- 20 Ensaio de Pepsan ELISA: Os cartões de polietileno no formato de cartão de crédito de 455 reservatórios, contendo os peptídeos covalentemente ligados, foram incubados com soro (diluídos 1:1000 em solução de bloqueio contendo 5 % de soro de cavalo (v/v) e 5 % de ovalbumina (p/v)) (4°C, durante a noite). Depois de lavar, os peptídeos foram incubados com peroxidase humana anti-anticorpo (diluição 1:1000, 1 hora, 25°C) e depois lavando o substrato de peroxidase, sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenztiazolina e 2 μ l/ml de H₂O₂ a 3 % foram adicionados. Depois de uma hora, o desenvolvimento de cor foi medido. O desenvolvimento de cor do ELISA foi quantificado com uma câmara de CCD e um sistema de

processamento de imagem. O arranjo consiste de uma câmara de CCD e uma lente de 55 mm (Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikk ou lente de 55 mm f/2,8), um adaptador de câmara (Sony Camera adaptor DC-77RR) e o Pacote de Software de Processamento de Imagem Optimas, versão 5 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, U.S.A.). Optimas roda em um sistema de computador Pentium II.

As absorbâncias (valores OD) para os peptídeos nas concentrações de anticorpo diferentes são mostrados na Tabela 4 e Tabela 5 abaixo.

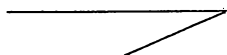


Tabela 4

	11B8 10 µg/ml	11B8 100 µg/ml	7D8 10 µg/ml	7D8 100 µg/ml	rituximab 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml	2F2 100 µg/ml	B1 10 µg/ml	B1 100 µg/ml
KMECLNFIRAHCPYI	763	2997	134	41	90	48	66	147	304
LKMECLNFIRCHTPY	165	738	160	41	120	49	87	179	216
KMESCNFIRACTPYI	625	3090	142	52	123	39	78	170	308
MESLCFIRAHCPYIN	179	956	127	55	102	41	65	119	178
CFIRAHTPC	188	534	181	69	134	91	114	170	212
CIRAHTPYC	151	449	186	60	132	57	92	151	195
CRAHTPYIC	427	1605	188	64	145	48	87	179	216
CAHTPYINC	179	452	174	65	125	42	106	161	172
IPAGIYA	217	950	164	76	177	48	85	165	192
PAGIYAP	449	2501	170	64	111	43	85	165	300
AGIYAPI	251	2207	188	73	110	44	98	187	143
GIYAPIC	99	251	152	64	141	34	93	177	147
IYAPICV	137	313	174	58	159	58	99	175	90
GIYAPIA	172	857	177	96	156	62	96	165	121
IYAPIAV	161	654	181	58	116	62	76	161	106

Tabela 5

	11B8 10 µg/ml	7D8 10 µg/ml	rituximab 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml
PCINIYNAEPANPCE	118	163	152	65
YCNIYNAEPANPSCK	287	181	2418	86
ICIYNAEPANPSECN	138	192	142	78
NCYNAEPANPSEKCS	93	121	2649	49
ICNAEPANPSEKNCP	115	165	3283	43
YCAEPANPSEKNSCS	106	188	3770	65
NCEPANPSEKNSPCT	159	183	3476	61
ACPANPSEKNSPSCQ	146	148	250	77
ECANPSEKNSPSTCY	134	179	188	68

Como torna-se óbvio a partir da Tabela 4, 11B8 mostrou ligação ao AGIYAP da alça extracelular primeira pequena de CD20 humana tanto a 10 µg/ml quanto 100 µg/ml, ao passo que os outros anticorpos testados não mostram ligação significativa ao AGIYAP.

Além disso, 11B8 mostrou ligação ao MESLNFIRAHTPYI da segunda alça extracelular de CD20 humana tanto a 10 µg/ml quanto a 100 µg/ml, ao passo que os outros anticorpos testados não mostram ligação significativa ao MESLNFIRAHTPYI.

Como torna-se óbvio a partir da Tabela 5, rituximab mostrou ligação ao EPANPSEK da segunda alça extracelular de CD20 humana tanto a 1 µg/ml quanto a 10 µg/ml, ao passo que os outros anticorpos testados não mostram ligação significativa ao EPANPSEK.

Exemplo 16 Anticorpos Anti-idiotípicos

Geração de anticorpos anti-idiotípicos: Anticorpos anti-idiotípicos de camundongo foram fabricados imunizando-se camundongos Balb/C com 2F2 ou 11B8T e gerando hibridomas a partir dos baços destes camundongos pela fusão com células de mieloma NS1 usando técnicas padrão. Os seguintes anticorpos anti-idiotípicos foram gerados: anti-2F2 sab 1,1, anti-2F2 sab 1,2, anti-2F2 sab 1,3, anti-11B8T sab 2,2, anti-11B8T sab 2,3, anti-11B8T sab 2,4, anti-11B8T sab 2,5 e anti-11B8T sab 2,6. Estes foram testados quanto a ligação específica ao 2F2T, 7D8 e 11B8T. Placas de

ELISA foram revestidas com 2F2T, 7D8 ou 11B8T purificados (diluídos em PBS para uma concentração final de 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$, 37°C, 2 horas). As placas foram bloqueadas com PBS contendo 0,05 % de Tween-20 e 2 % de soro de frango (temperatura ambiente, 1 hora). Subsequentemente, as placas foram incubadas com sobrenadantes a partir das culturas dos anticorpos anti-idiotípicos (concentração final ajustada para 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$, temperatura ambiente, 2 horas). Os anticorpos anti-idiotípicos de camundongo ligados foram detectados com anticorpo conjugado com IgG-HRP anti-camundongo de coelho (Jackson ImmunoResearch).

10 Como mostrado na Figura 50 anti-2F2 sab 1,1, anti-2F2 sab 1,2 e anti-2F2 sab 1,3 se ligam a 2F2T e 7D8, mas não a 11B8T ou um anticorpo humano de controle de isótipo, não relacionado. Visto que 2F2T e 7D8 são muito homólogos em sequência V_L e V_H , a reação de anticorpos idiotípicos anti-2F2 com 7D8 foi esperado.

15 A Figura 51 mostra que anti-11B8T sab 2,2, anti-11B8T sab 2,3, anti-11B8T sab 2,4, anti-11B8T sab 2,5 e anti-11B8T sab 2,6 todos se ligam a 11B8T em um grau similar.

Anticorpos anti-idiotípicos como uma ferramenta de imunodiagnóstico: Os anticorpos anti-idiotípicos específicos de 2F2/7D8 e 11B8T podem ser usados como uma ferramenta de imunodiagnóstico para detectar e quantificar níveis de anticorpos monoclonais humanos contra CD20 em amostras de laboratório ou do paciente. Isto pode ser útil para examinar farmacocinéticas do anticorpo anti-CD20 ou para determinar e ajustar a dosagem do anticorpo anti-CD20 e para monitorar a doença e o efeito de tratamento em um paciente. Como um exemplo de um tal ensaio, placas de ELISA foram revestidas com 4 $\mu\text{g/ml}$ de anti-2F2 sab 1,1, anti-2F2 sab 1,2 ou anti-2F2 sab 1,3. As placas foram bloqueada com PBS contendo 0,05 % de Tween-20 e 2 % de soro de frango (temperatura ambiente, 1 hora). Subsequentemente, as placas foram incubadas com uma diluição em série de

20

25

2F2T (10.000-9,77 ng/ml, temperatura ambiente, 2 horas). O 2F2T ligado foi detectado com anticorpo conjugado com IgG HRP anti-humano de camundongo. Como mostrado nas figuras 52A-C uma ligação dependente da dose de 2F2T foi observada.

5 Equivalentes

Aqueles habilitados na técnica reconhecerão ou serão capazes de averiguar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das formas de realização específicas da invenção aqui descritas. Tais equivalentes são intencionados a serem abrangidos pelas seguintes reivindicações. Qualquer combinação das formas de realização divulgadas nas reivindicações dependentes também é considerada estar dentro do escopo da invenção.

10

 Incorporação por Referência

15

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

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano isolado, caracterizado pelo fato de que se liga à CD20 humana, que compreende

(i) uma sequência V_H CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 13, uma sequência V_H CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 14, uma sequência V_H CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 15, uma sequência V_L CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 16, uma sequência V_L CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 17, e uma sequência V_L CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 18;

(ii) uma sequência V_H CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 19, uma sequência V_H CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 20, uma sequência V_H CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 21, uma sequência V_L CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 22, uma sequência V_L CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 23, e uma sequência V_L CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 24; ou

(iii) uma sequência V_H CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 25, uma sequência V_H CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 26, uma sequência V_H CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 27, uma sequência V_L CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 28, uma sequência V_L CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 29, e uma sequência V_L CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 30

2. Anticorpo monoclonal humano isolado, caracterizado pelo fato de que se liga à CD20 humana e que possui:

(i) regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia leve capa humana que compreendem seqüências de aminoácido como apresentadas nas SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente;

(ii) regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia leve capa humana que compreendem seqüências de aminoácido como apresentadas nas SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8, respectivamente;

(iii) regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia

leve capa humana que compreendem seqüências de aminoácido como apresentadas nas SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12, respectivamente, e suas modificações de seqüência conservativas; ou

3. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo inteiro selecionado do grupo que consiste em: um anticorpo IgG1 inteiro, um anticorpo IgG2 inteiro, um anticorpo IgG3 inteiro, e um anticorpo IgG4 inteiro, em que o anticorpo é glicosilado em uma célula eucariótica.

4. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia única.

5. Célula hospedeira procariótica, caracterizada pelo fato de que produz um anticorpo monoclonal humano tendo regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve que compreendem as seqüências de nucleotídeo como apresentadas nas SEQ ID NOs: 1 e 3, respectivamente, as seqüências de ácido nucleico como definidas nas SEQ ID NOs: 5 e 7, respectivamente, ou as seqüências de ácido nucleico como definidas nas SEQ ID NOs: 9 e 11.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo humano conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e um carregador farmacêuticamente aceitável.

7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que compreende uma combinação de dois ou mais anticorpos humanos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, que têm atividades funcionais complementares.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro anticorpo tendo regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia leve capa humana que compreendem as seqüências de aminoácido como apresentadas nas SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente; e um segundo anticorpo tendo

regiões variáveis de cadeia pesada humana e de cadeia leve capa humana que compreendem as sequências de aminoácido como apresentadas na SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12, respectivamente.

9. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um agente terapêutico selecionado a partir do grupo que consiste em doxorubicina, cisplatina, bleomicina, carmustina, clorambucila, ciclofosfamida, anticorpos anti-CD25, anticorpos anti-CD19, anticorpos anti-CD21, anticorpos anti-CD22, anticorpos anti-CD37, anticorpos anti-CD38, anticorpos anti-IL6R, anticorpos anti-IL8, anticorpos anti-IL15, anticorpos anti-IL15R, anticorpos anti-CD4, anticorpos anti-CD11a, anticorpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4), CTLA4-Ig e anticorpos anti-C3b(i).

10. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende um ligador quelador para ligar um radioisótopo.

11. Molécula biespecífica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e uma especificidade de ligação para uma célula efetora humana.

12. Molécula biespecífica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e uma especificidade de ligação para um receptor Fc humano ou uma especificidade de ligação para um receptor de célula T, tal como CD3.

13. Uso de um anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para inibir o crescimento de, ou para matar, uma célula que expressa CD20 em um paciente.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo

fato de que a célula é um linfócito B ou uma célula de tumor.

15. Uso de um anticorpo, composição, ou molécula biespecífica humana, conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 6 a 12, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio que envolvam células que expressam CD20 em um paciente.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença é um linfoma de célula B.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença é linfoma não de Hodgkin de célula B.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença é selecionada do grupo que consiste em leucemia/linfoma linfoblásticos de célula B precursores e neoplasmas de célula B maduros, tais como a leucemia linfocítica crônica de célula B (CLL)/linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia prolinfocítica de célula B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de célula de manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma do centro de folículo cutâneo, linfoma de célula B de zona marginal (MALT, tipo nodal e tipo esplênico), leucemia de célula pilosa, linfoma de célula B grande difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de célula plasmática, distúrbio linfoproliferativo pós transplante, macroglobulinemia de Waldenström e linfoma de célula grande anaplástico (ALCL).

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a doença é o linfoma folicular (FL) ou a leucemia linfocítica crônica de célula B (CLL)/linfoma linfocítico pequeno (SLL).

20. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença é selecionada do grupo que consiste de granulomatose linfomatóide, linfoma de efusão primária, linfoma de célula B intravascular grande, linfoma de célula B mediastinal grande, doenças de cadeia pesada

(incluindo doença de γ , μ e α), linfomas induzidos pela terapia com agentes imunossupressivos, tais como linfoma induzido por ciclosporina e linfoma induzido por metotrexato.

21. Uso de um anticorpo, composição ou molécula biespecífica, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 6 a 12, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença imune que envolva células imunes que expressem CD20 em um paciente.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o tratamento inclui a morte de células B que produzem anticorpos contra autoantígenos.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio são selecionados do grupo que consiste de psoríase, artrite psoriática, dermatite, escleroderma sistêmico e esclerose, doença do intestino inflamatório (IBD), doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência na adesão de leucócito, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behçet, nefrite do complexo imune, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenias imuno-mediadas, tais como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefrite de lupo, lupo eritematoso sistêmico, artrite reumatóide (RA), dermatite atópica, pênfigo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, granulomatose de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, HIV e doenças associadas ao vírus do herpes.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a doença autoimune é a artrite reumatóide (RA).

25. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo

fato de que a doença é um distúrbio inflamatório, imune e/ou autoimune selecionado de colite ulcerativa, doença de Crohn, diabetes juvenil, esclerose múltipla, trombocitopenias imuno-mediadas, tais como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia grave, esclerose sistêmica e pênfigo vulgar.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a doença é um distúrbio inflamatório, imune e/ou autoimune selecionado de doença do intestino inflamatório (IBD), colite ulcerativa, doença de Crohn e esclerose múltipla.

27. Método *in vitro* de detectar a presença de antígeno de CD20 ou uma célula que expressa CD20 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

contatar a amostra com o anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e CD20;

detectar a formação de um complexo; e

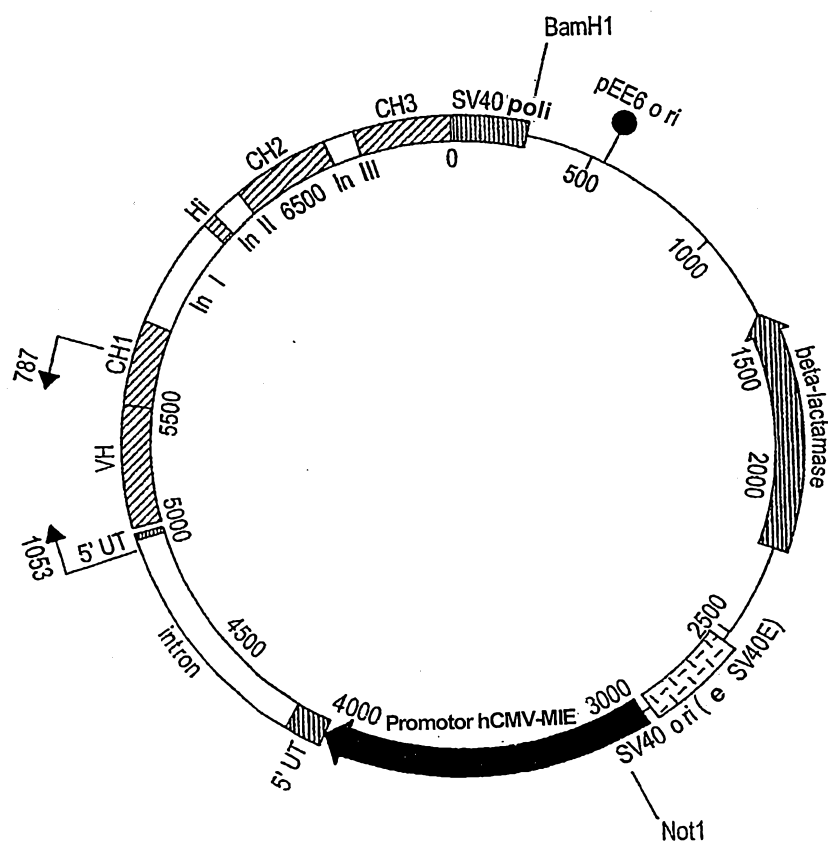
comparar a diferença na formação de um complexo entre a amostra e uma amostra controle como uma medida da presença de antígeno CD20 na amostra.

28. Kit para detectar a presença de antígeno de CD20 ou uma célula que expressa CD20 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 24 e instruções para uso.

29. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica uma região variável de cadeia pesada que compreende um nucleotídeo selecionado do grupo que consiste das sequências de nucleotídeo como apresentadas nas SEQ ID NOs: 1, 5 e 9 e uma região variável leve que compreende uma sequência de

nucleotídeo selecionada do grupo que consiste das seqüências de nucleotídeo como apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 7 e 11 e suas modificações conservativas.

30. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão conforme definido na reivindicação 29 e um carregador farmaceuticamente aceitável.

*Fig. 1*

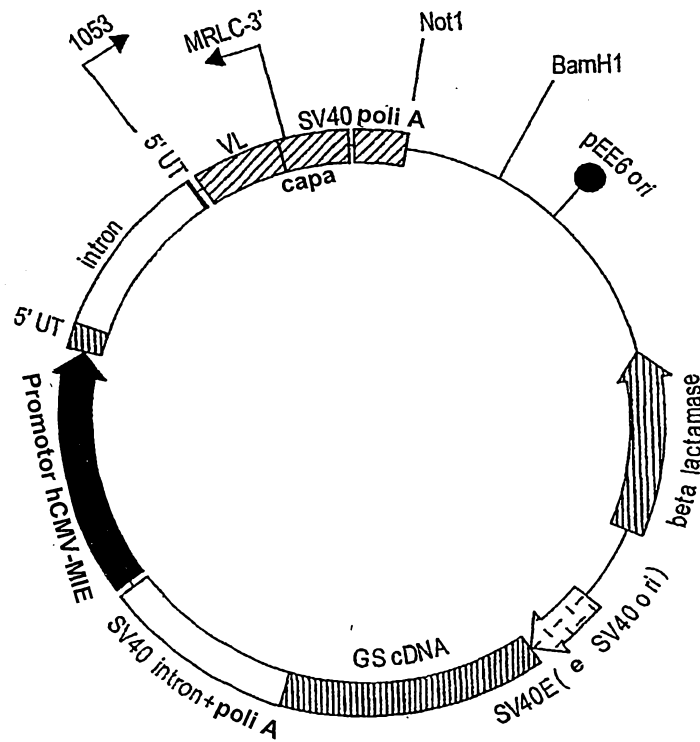


Fig. 2

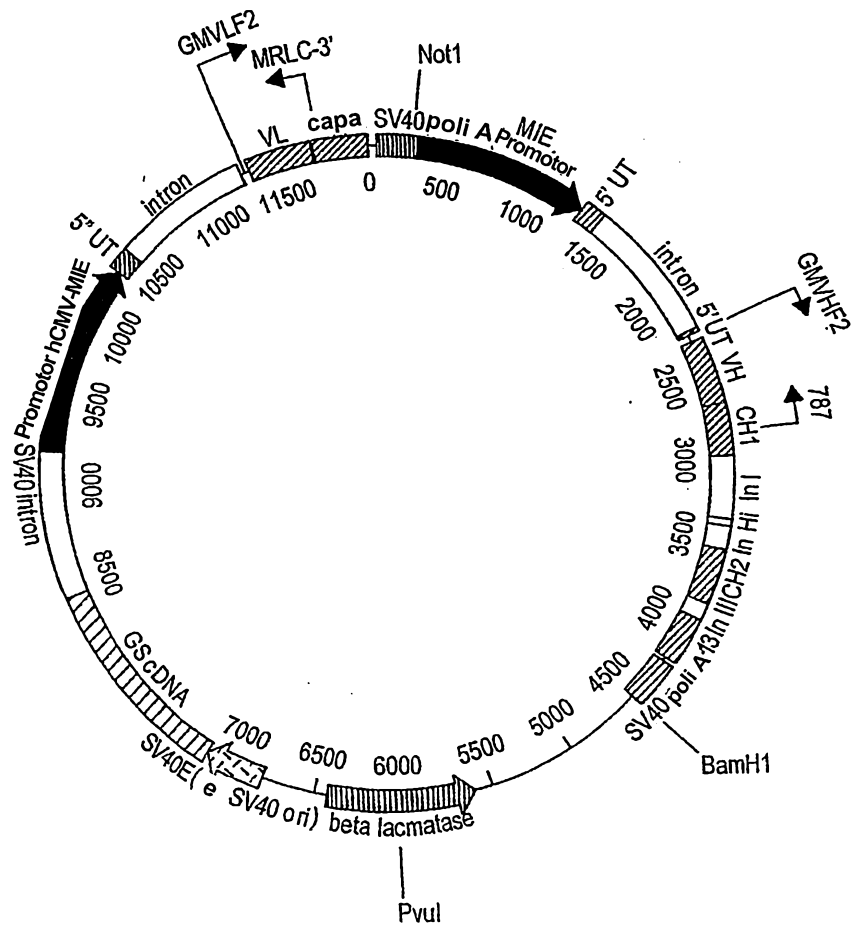
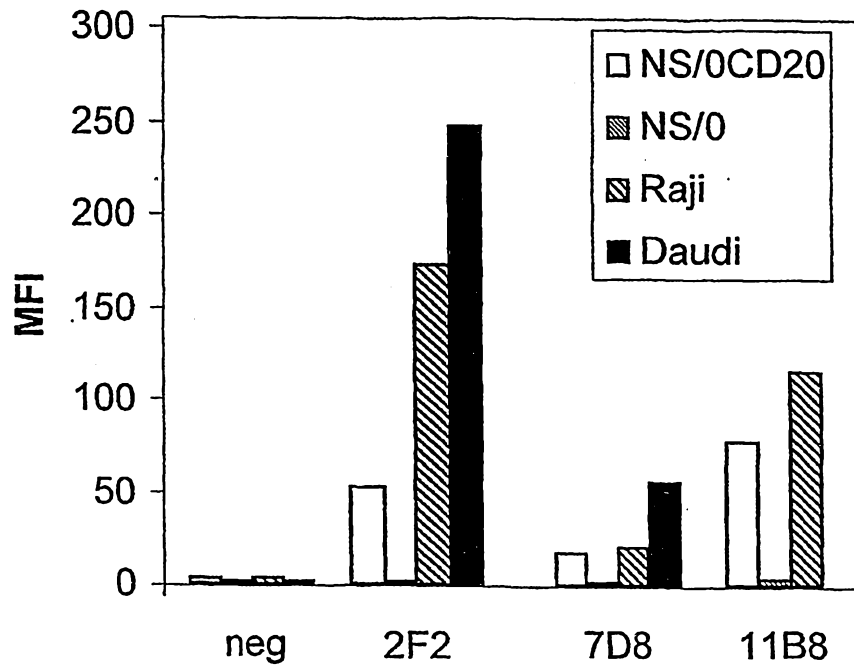
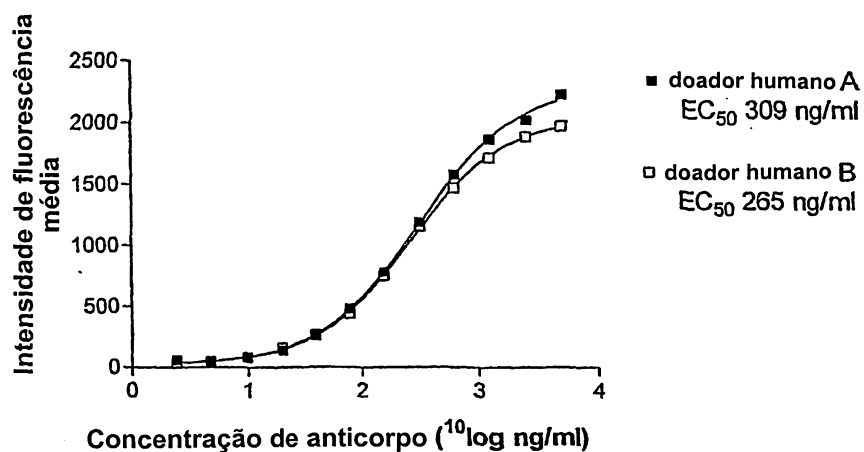
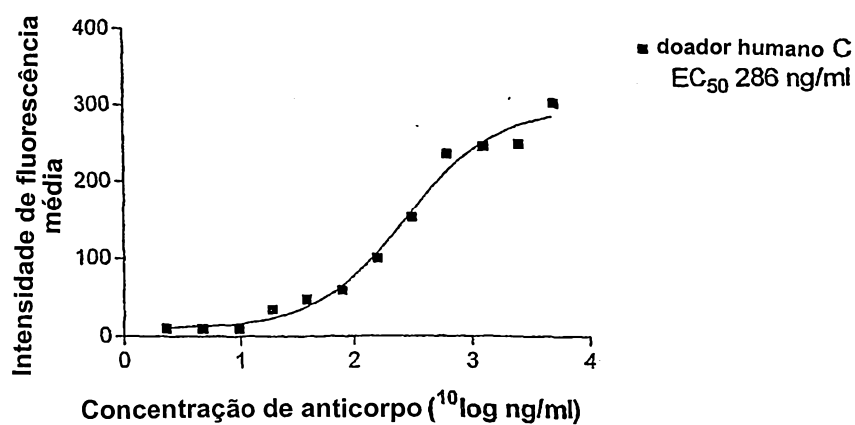
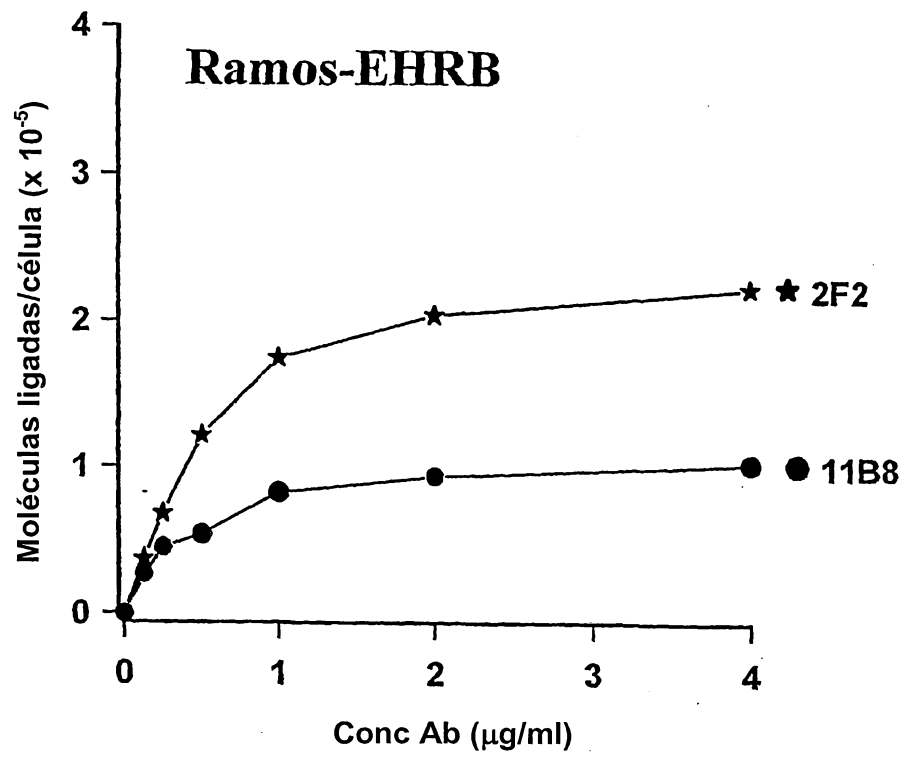


Fig. 3

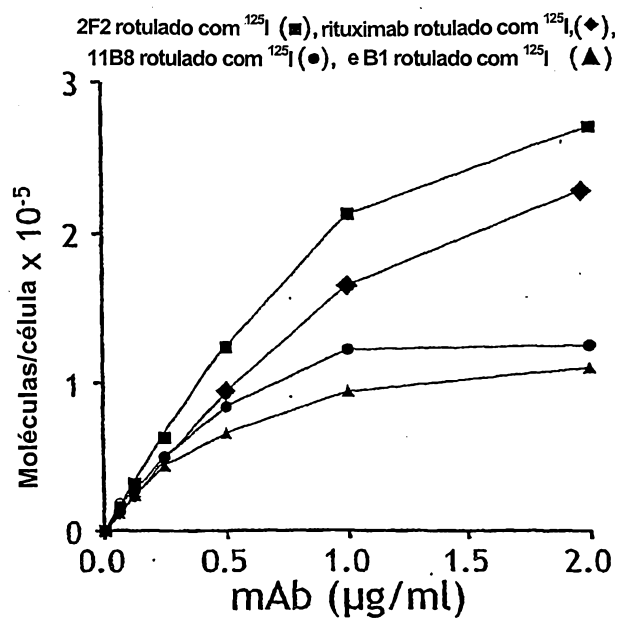
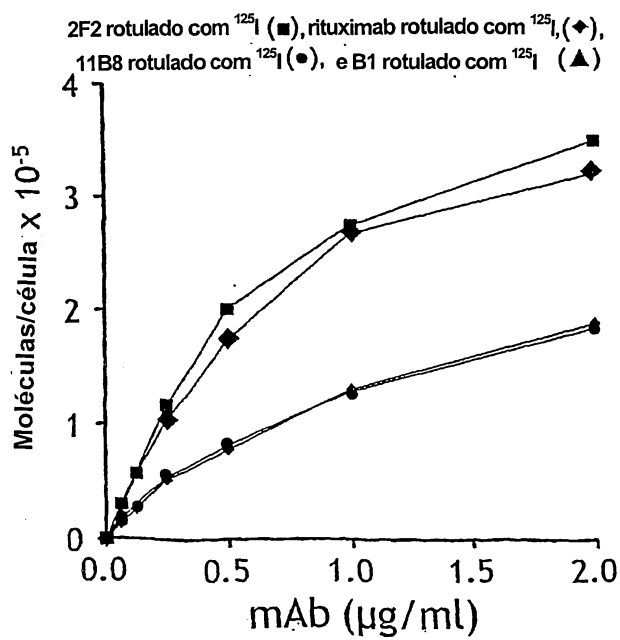
*Fig. 4*

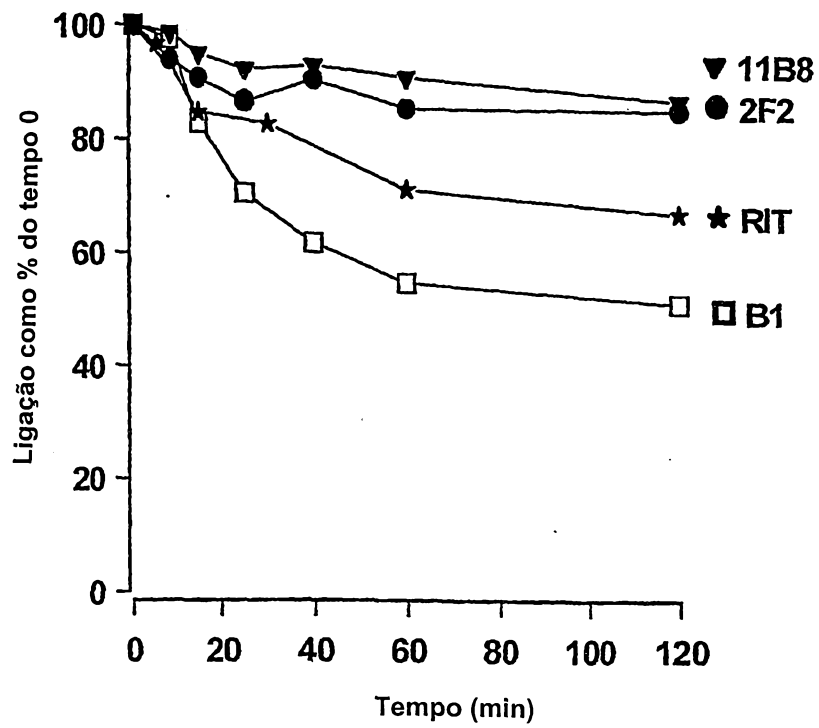
*Fig. 5A**Fig. 5B*

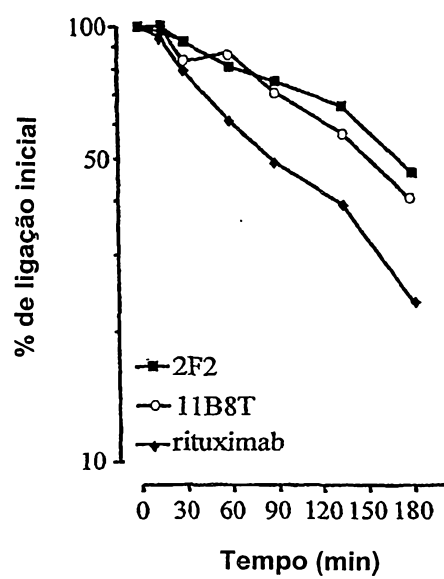
*Fig 6*

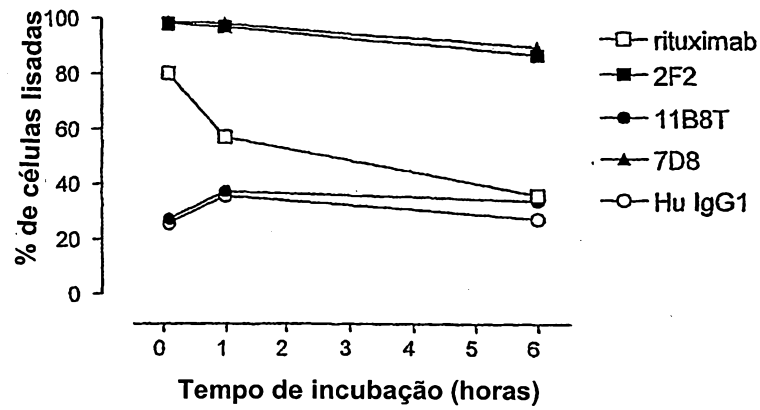
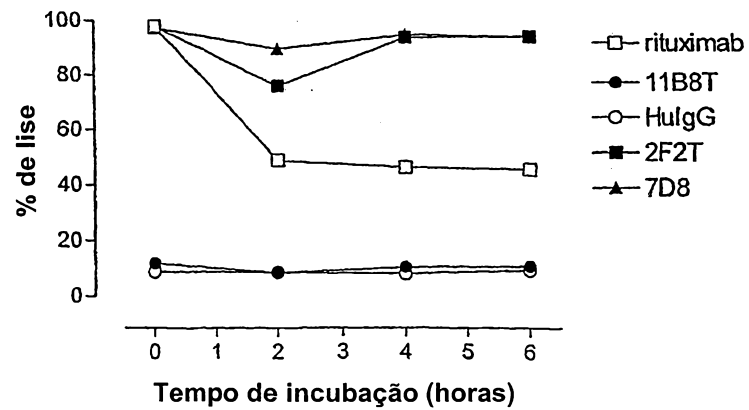
7/65

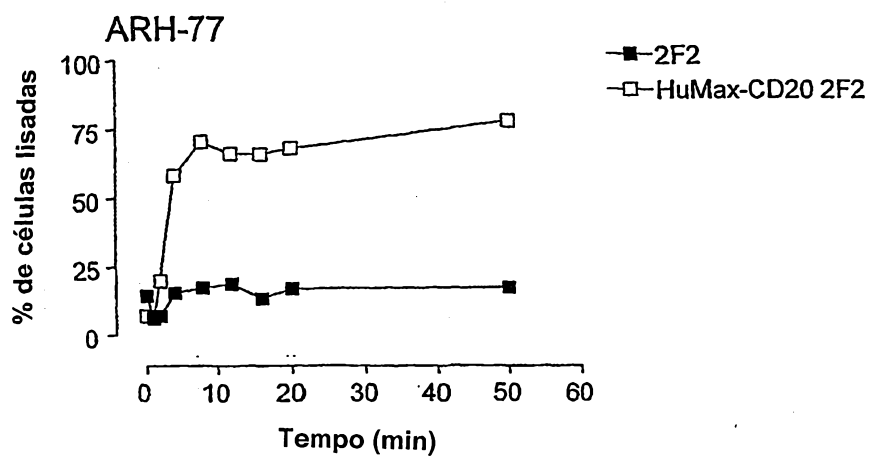
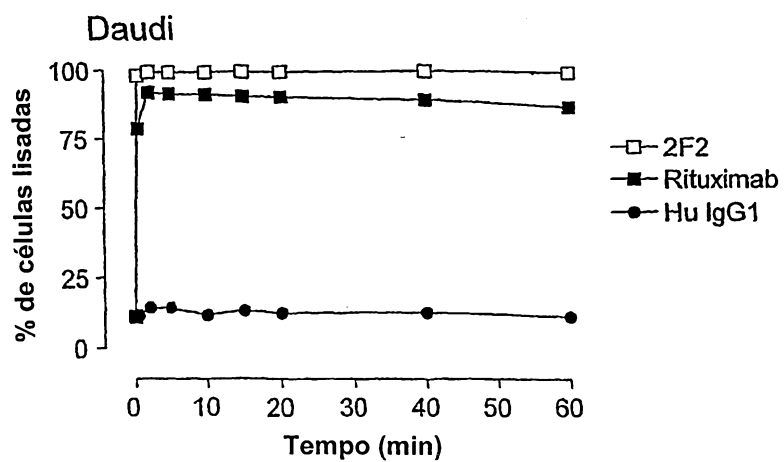
P10315295

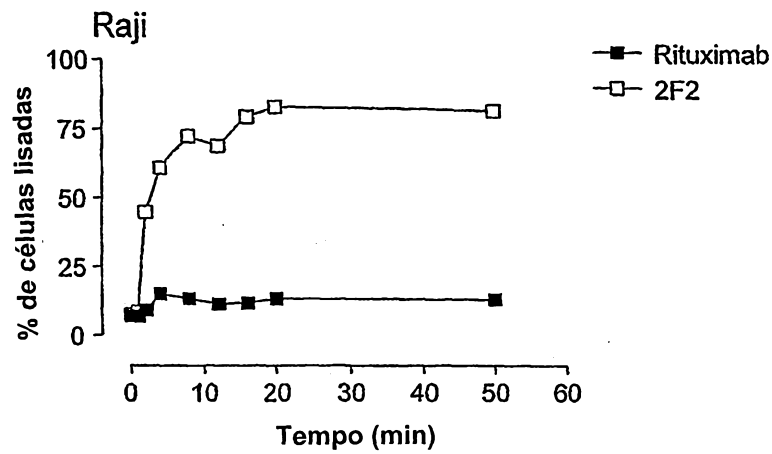
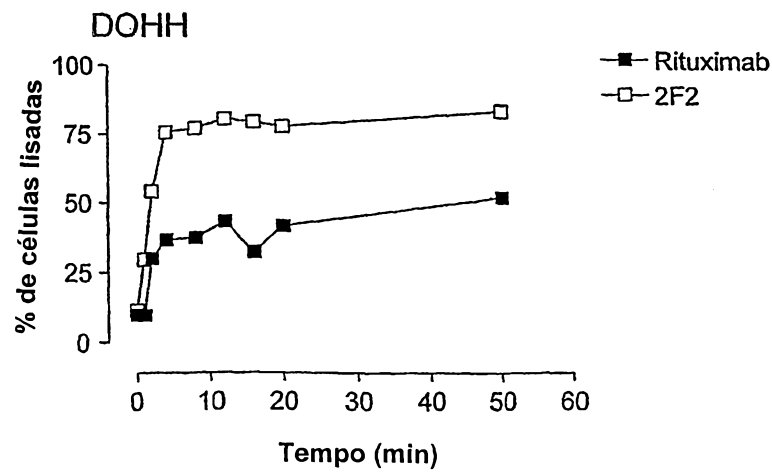
*Fig. 7A**Fig. 7B*

*Fig. 8*

*Fig. 9*

*Fig. 10A**Fig. 10B*

*Fig. 11A**Fig. 11A*

*Fig. 11C**Fig. 11D*

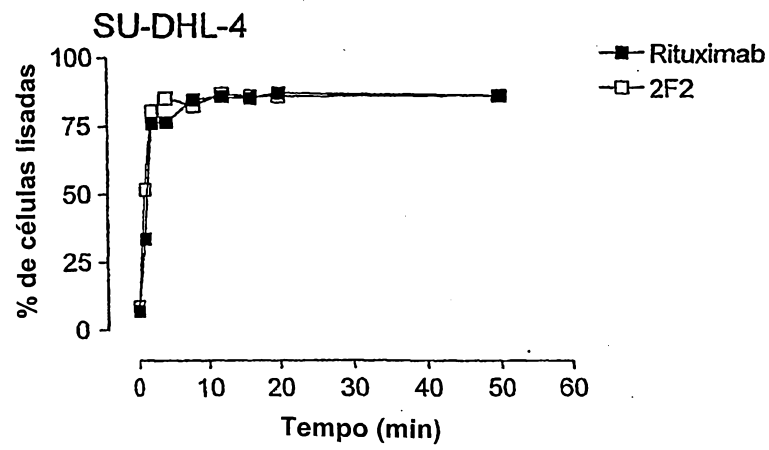
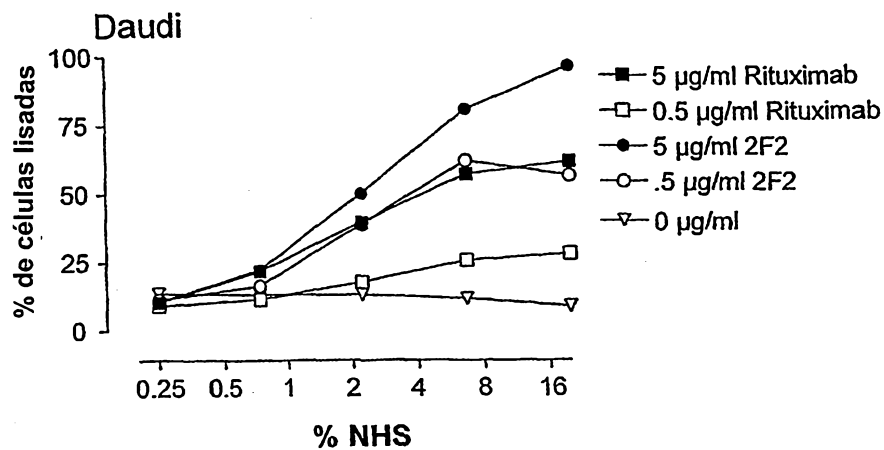
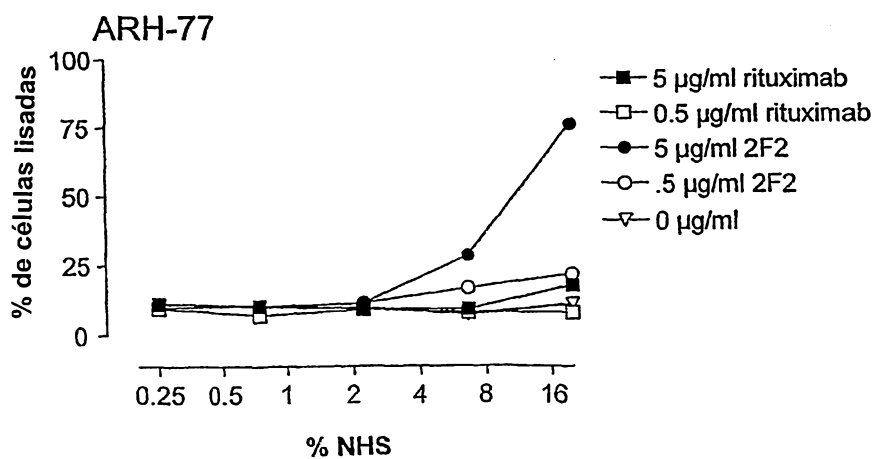
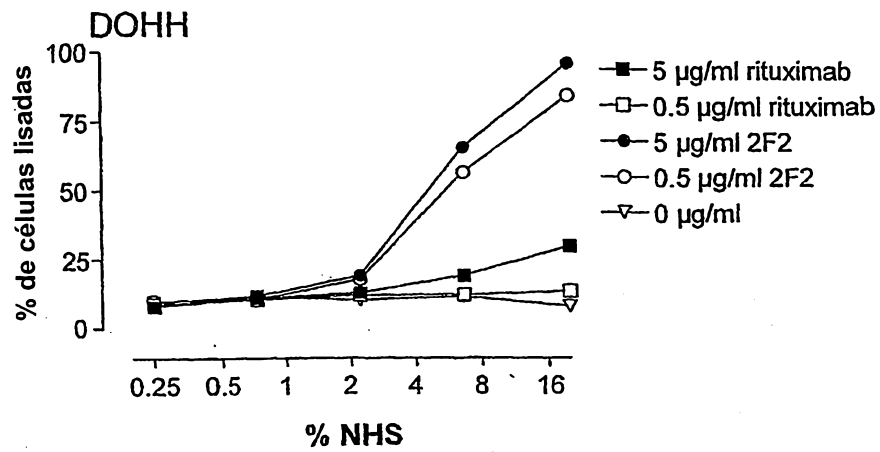
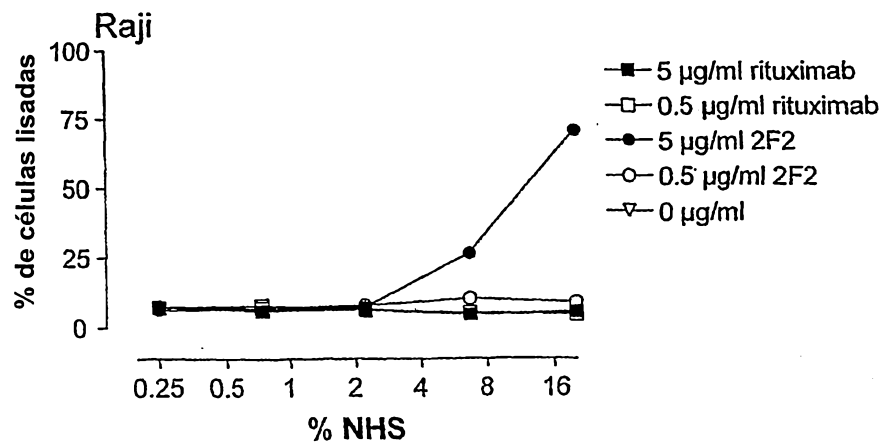
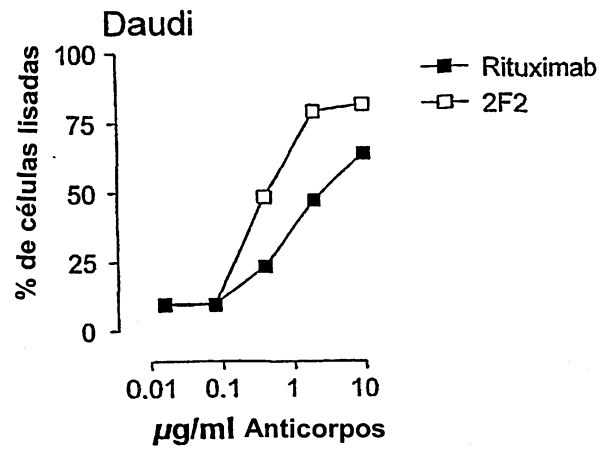
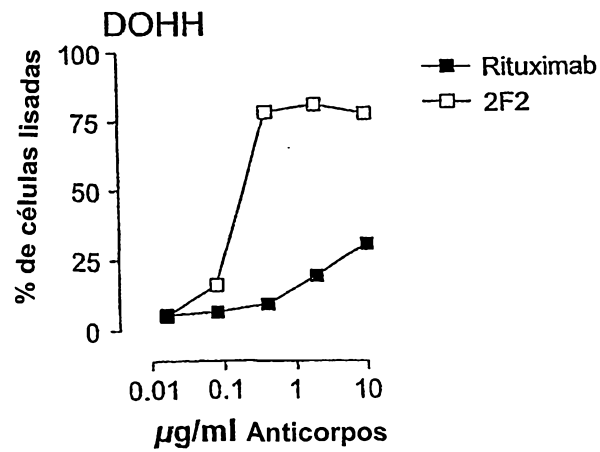
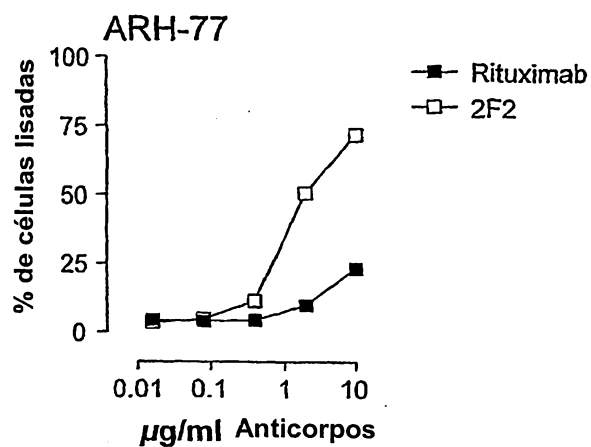
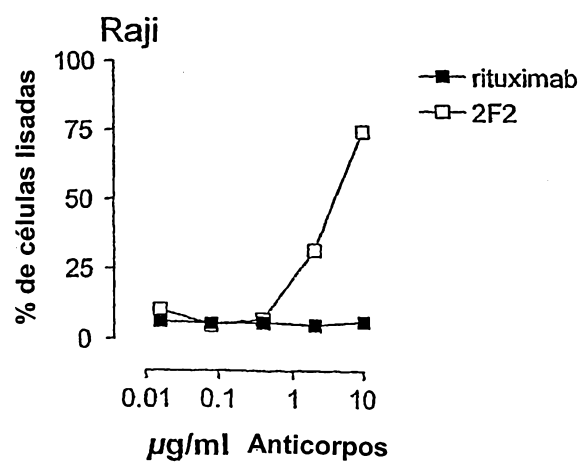


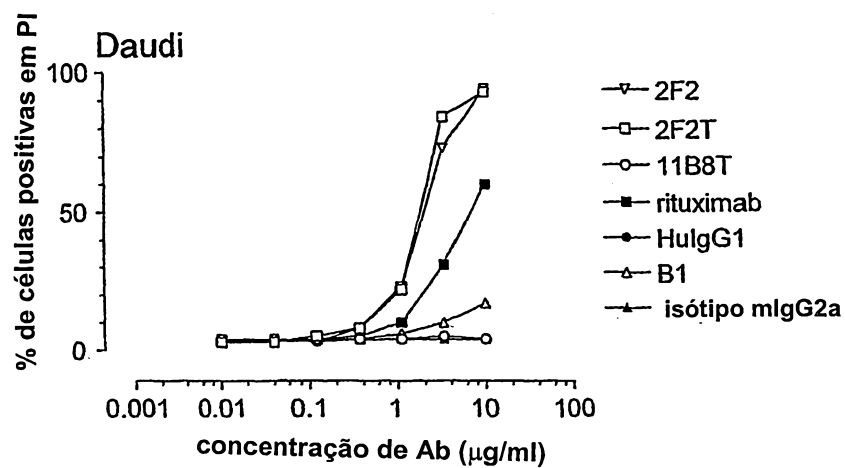
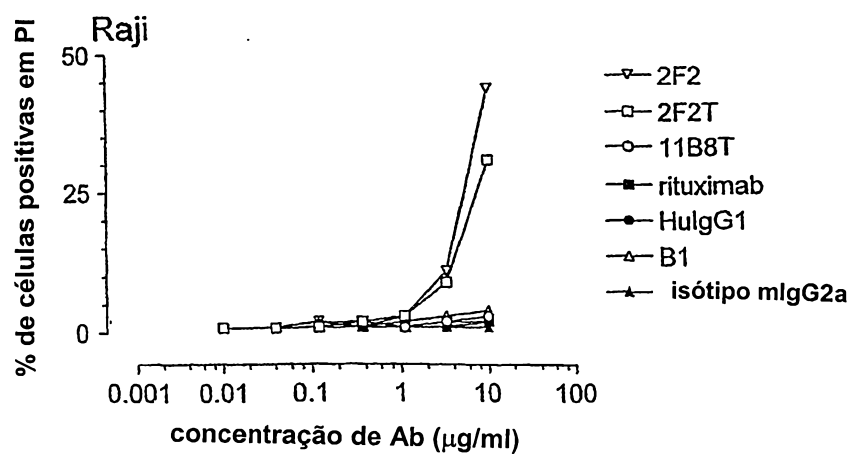
Fig. 11E

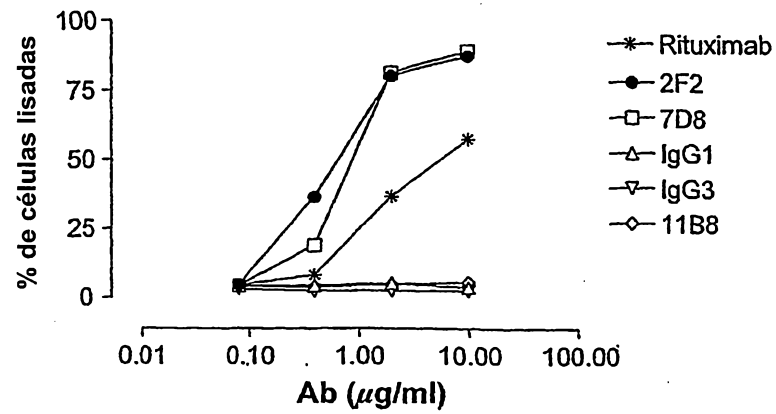
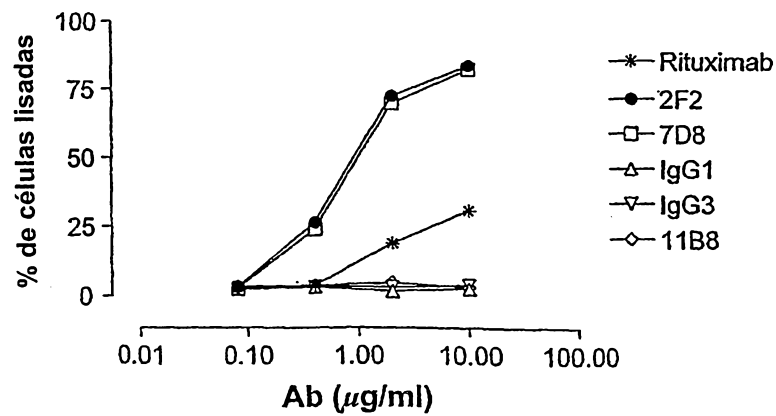
*Fig. 12A**Fig. 12B*

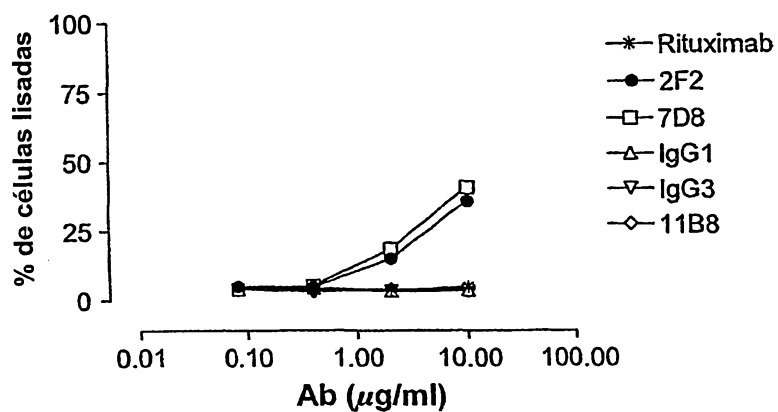
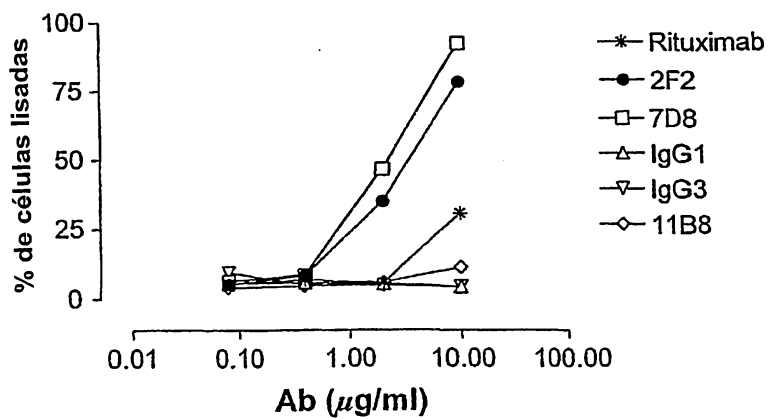
*Fig. 12C**Fig. 12D*

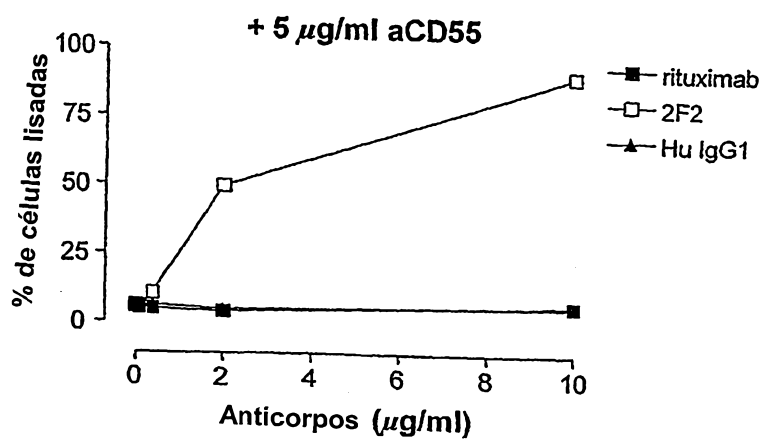
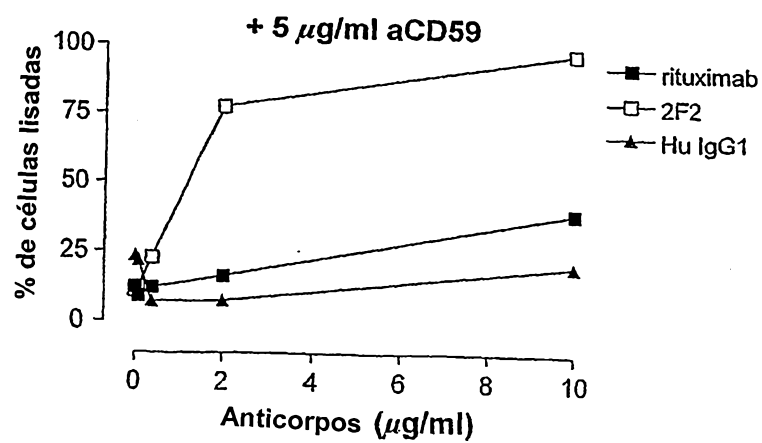
*Fig. 13A**Fig. 13B*

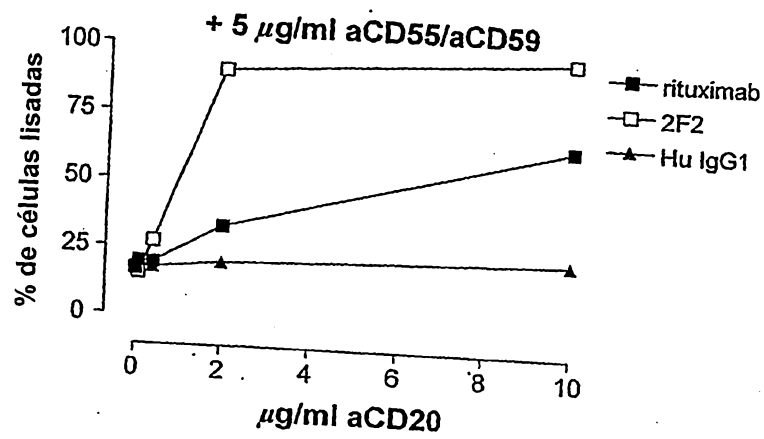
*Fig. 13C**Fig. 13D*

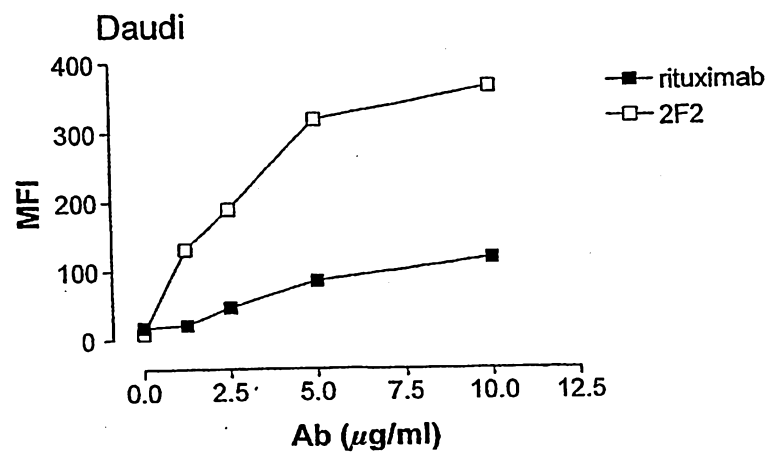
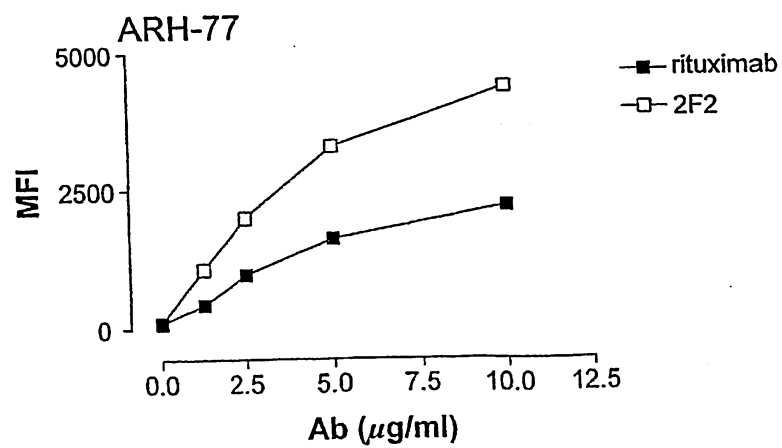
*Fig. 14A**Fig. 14B*

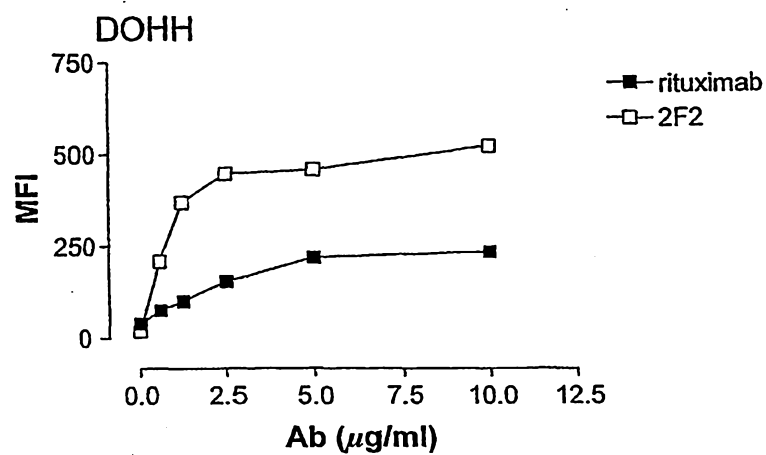
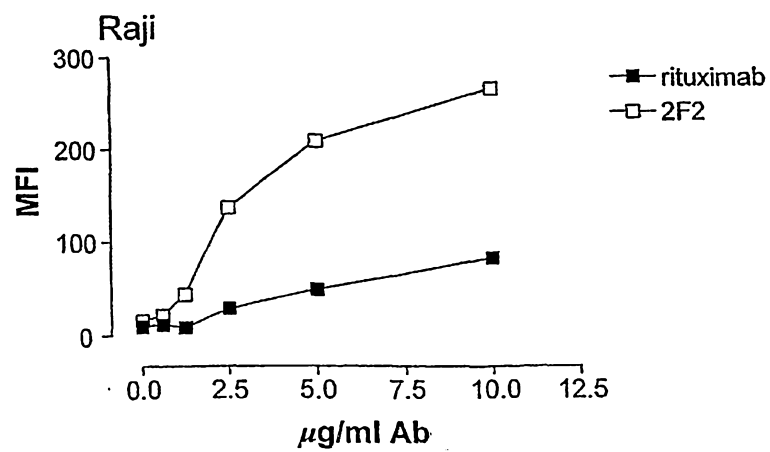
*Fig. 15A**Fig. 15B*

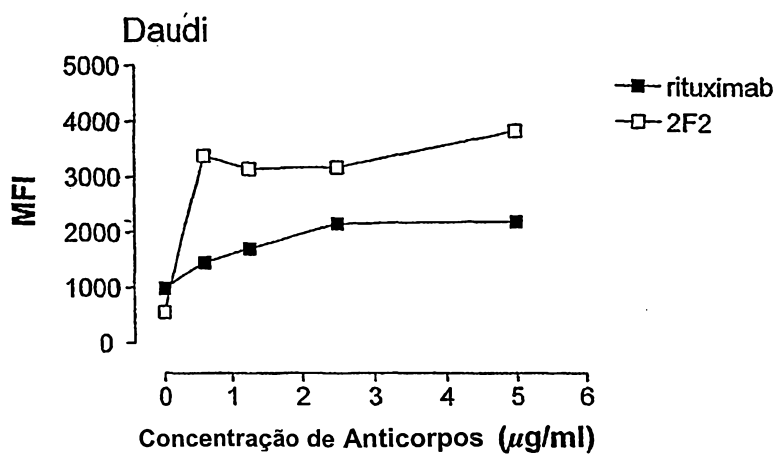
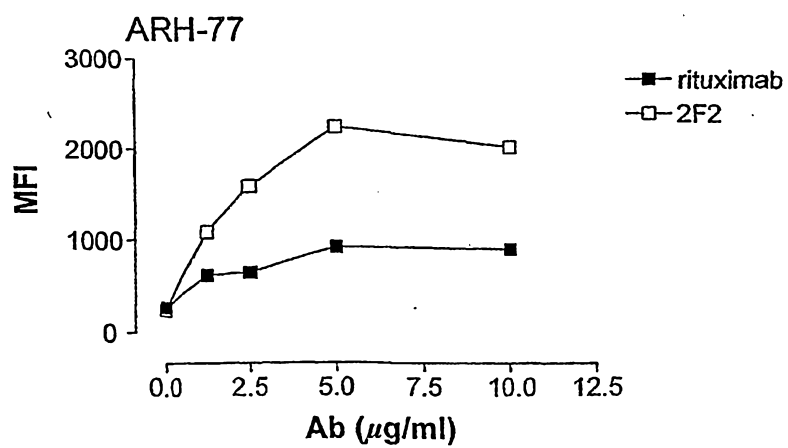
*Fig. 16A**Fig. 16B*

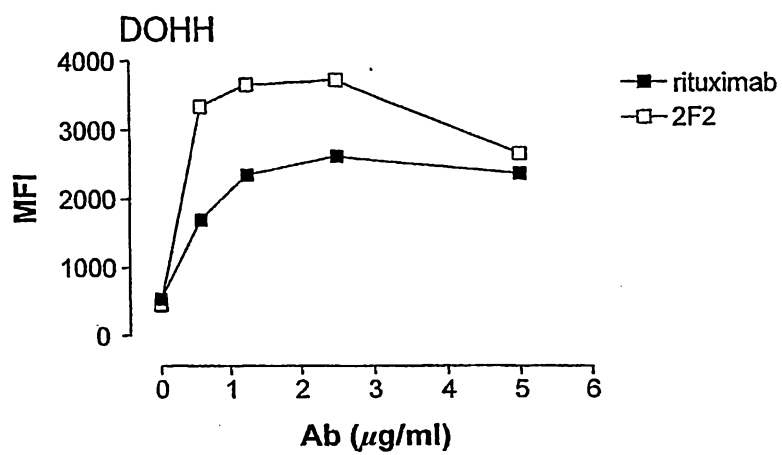
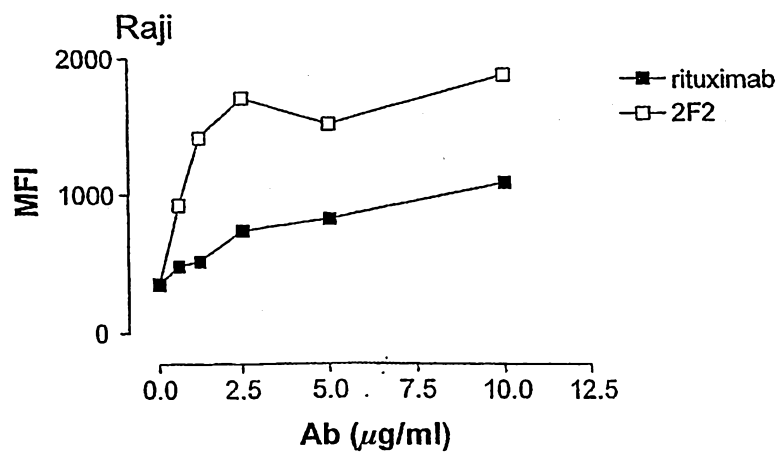
*Fig. 17A**Fig. 17B*

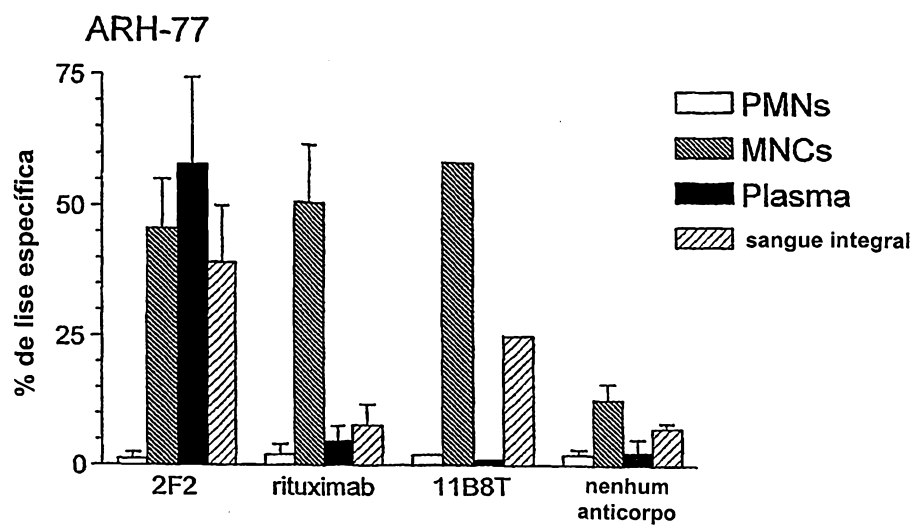
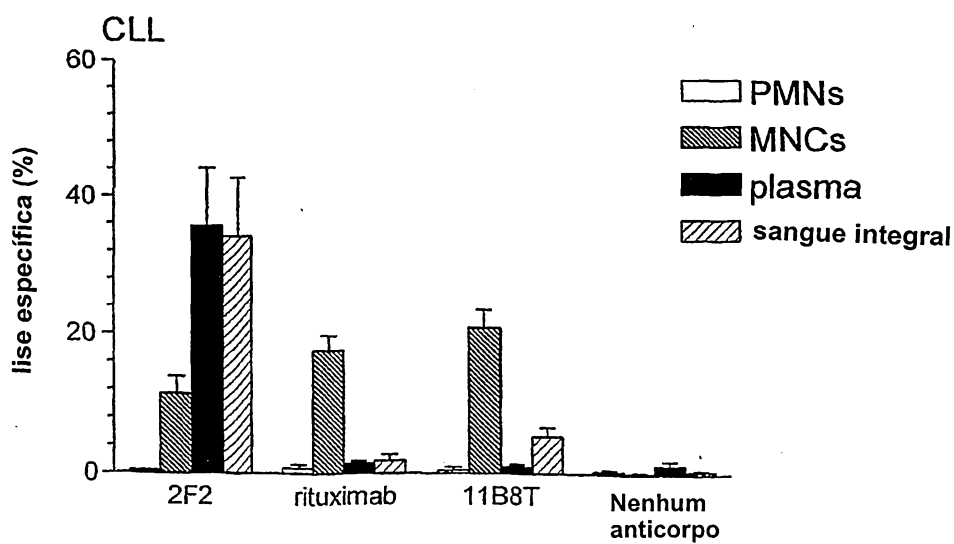
*Fig. 17C*

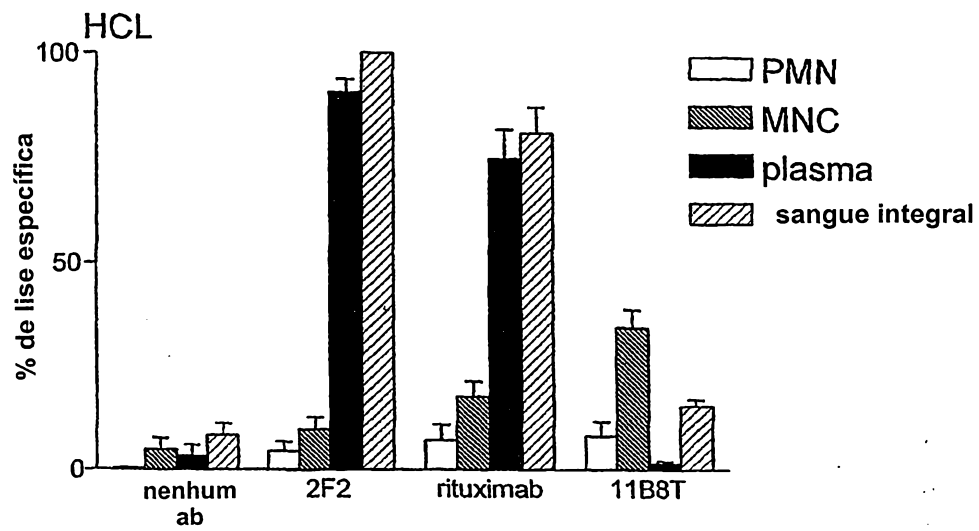
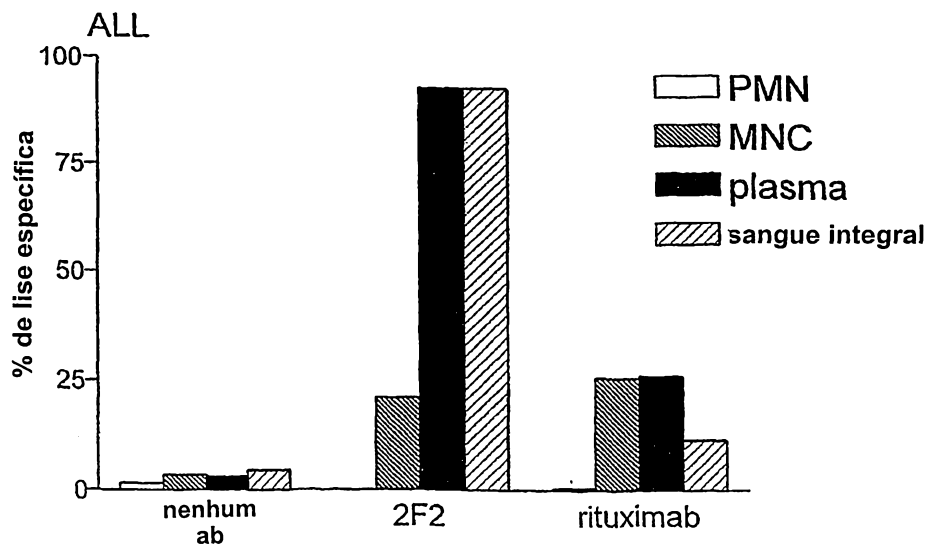
*Fig. 18A**Fig. 18B*

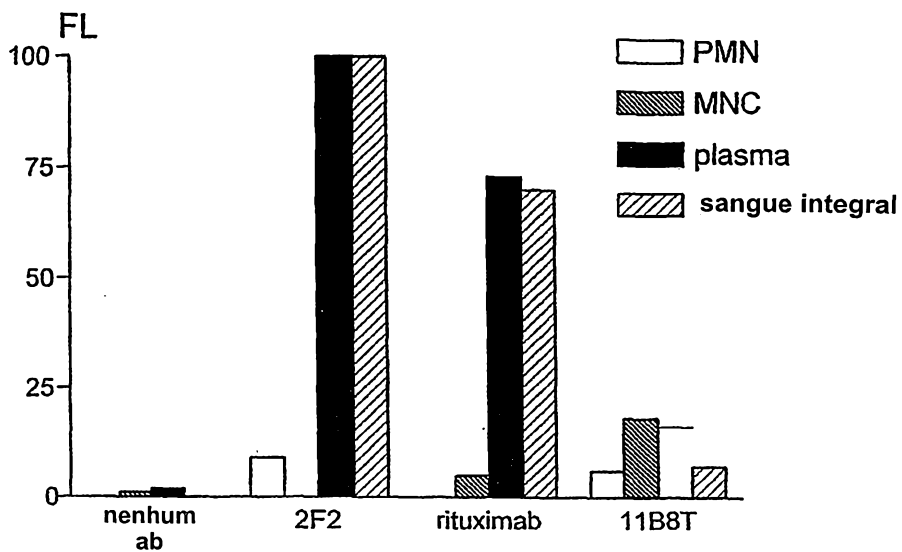
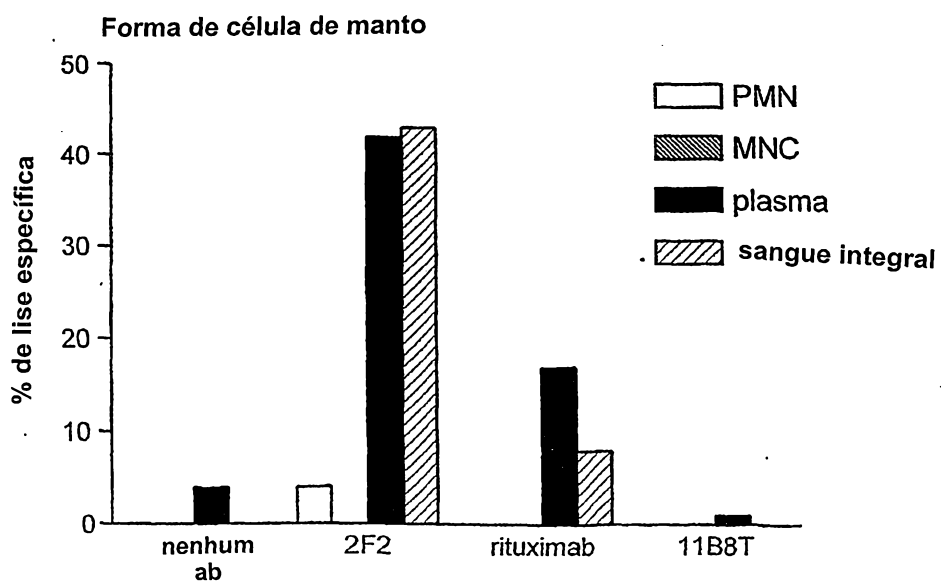
*Fig. 18C**Fig. 18D*

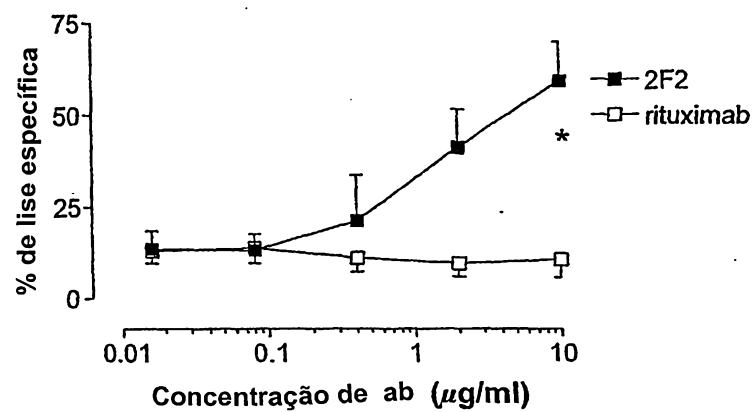
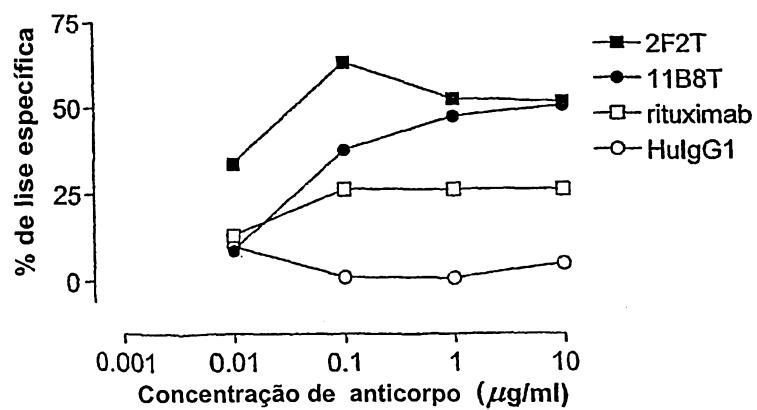
*Fig. 19A**Fig. 19B*

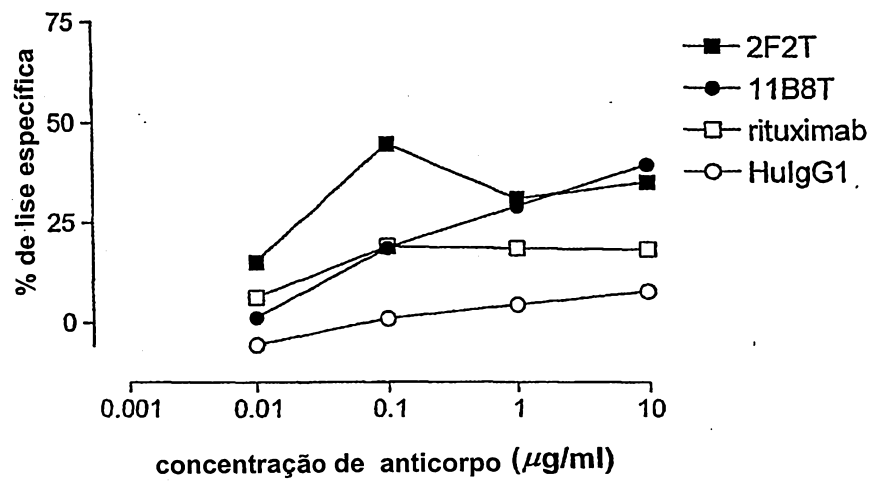
*Fig. 19C**Fig. 19D*

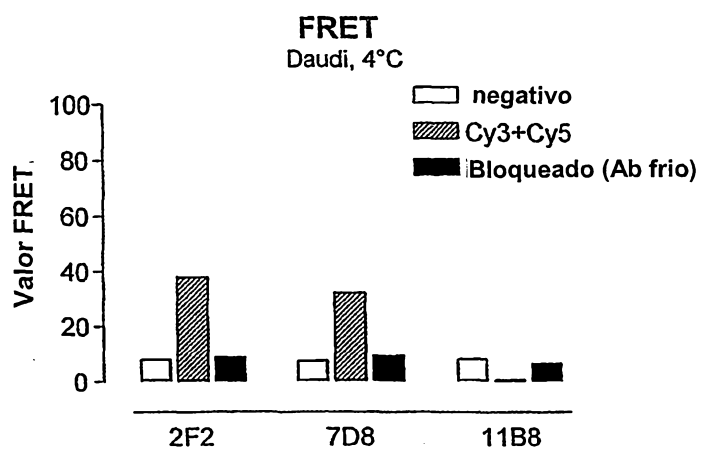
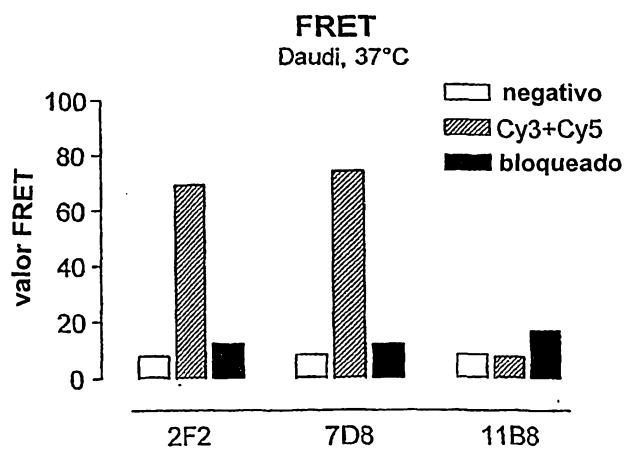
*Fig. 20**Fig. 21*

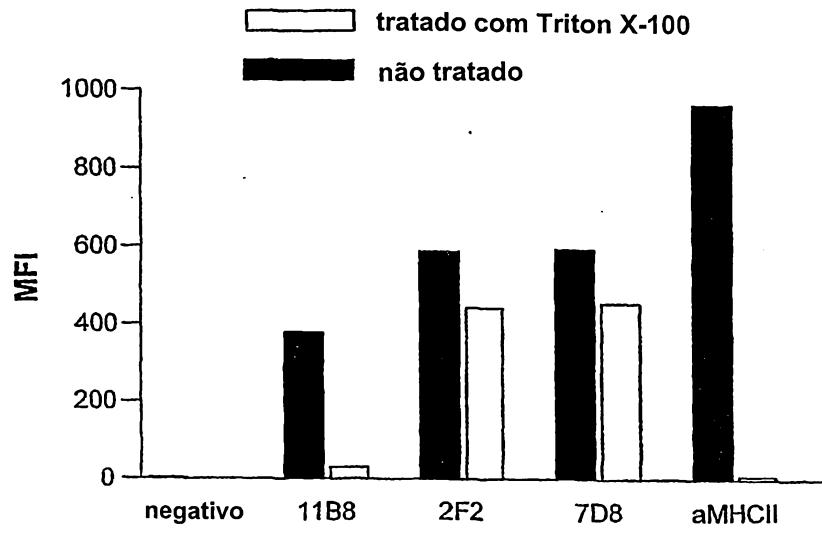
*Fig. 22**Fig. 23*

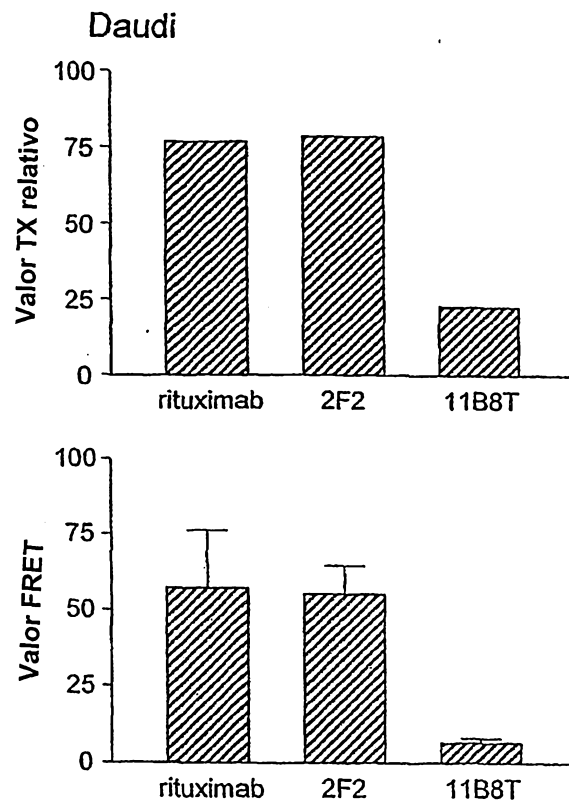
*Fig. 24**Fig. 25*

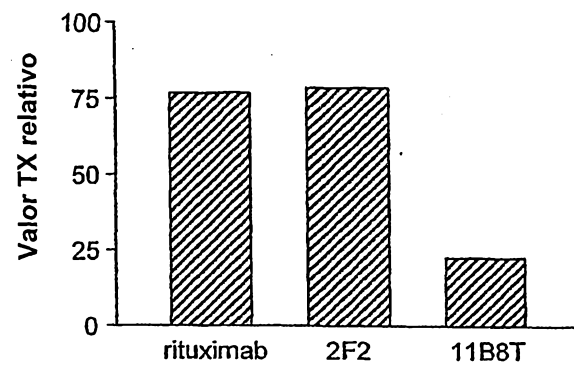
*Fig. 26**Fig. 27*

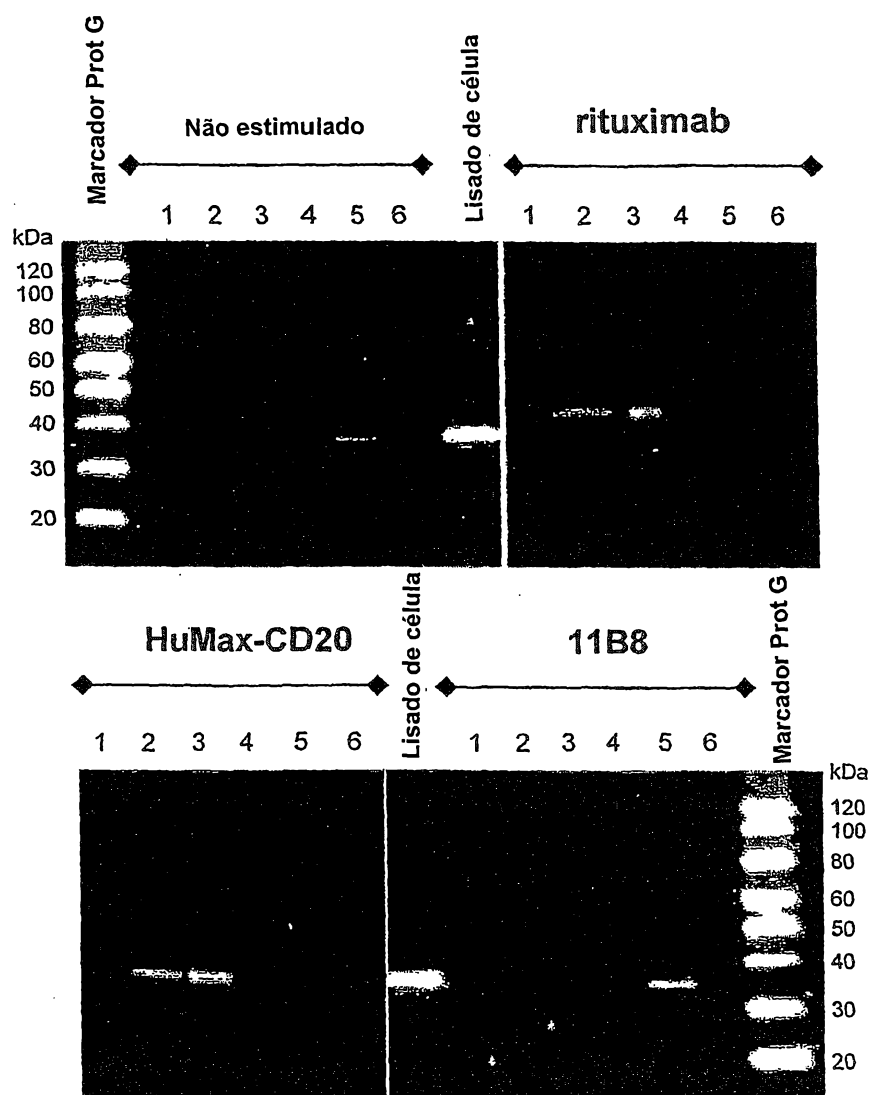
*Fig. 28*

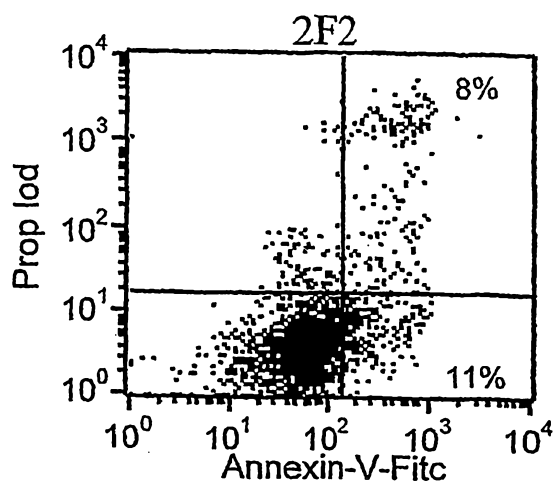
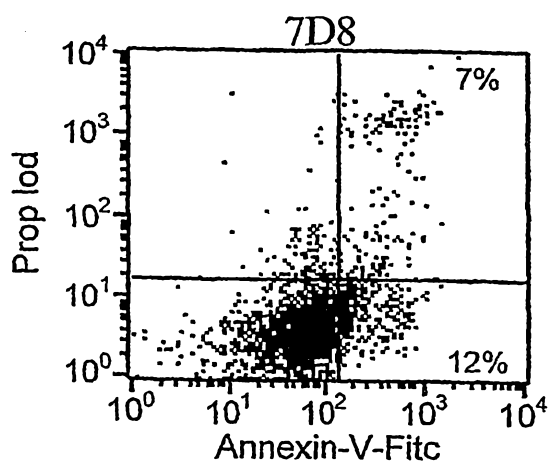
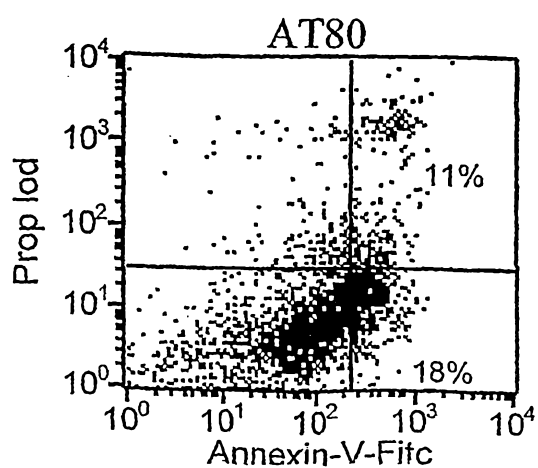
*Fig. 29A**Fig. 29B*

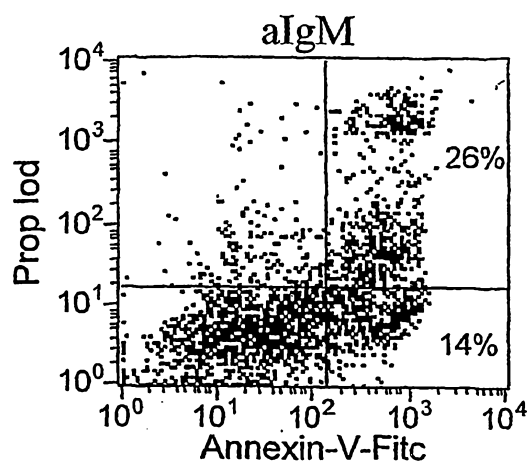
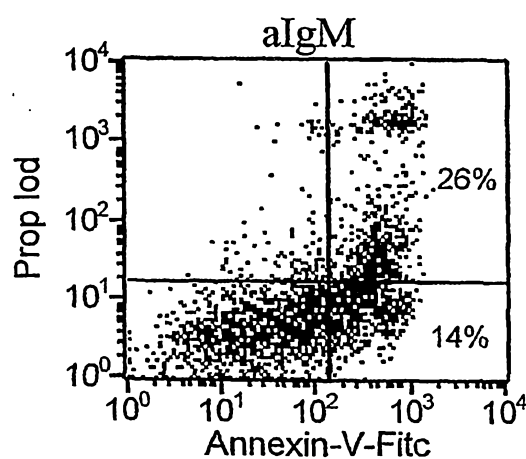
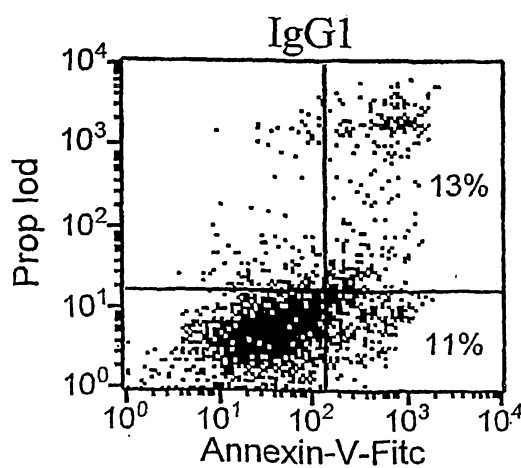
*Fig. 29C*

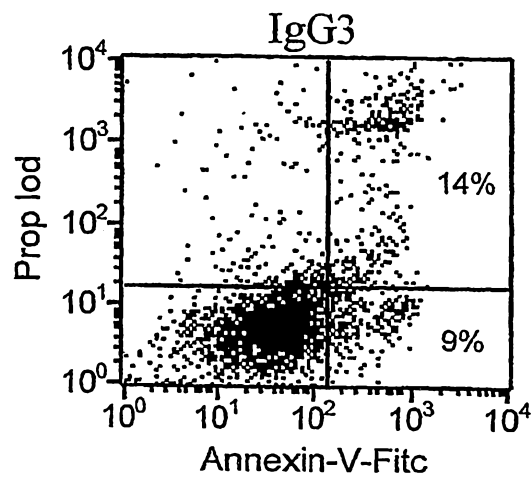
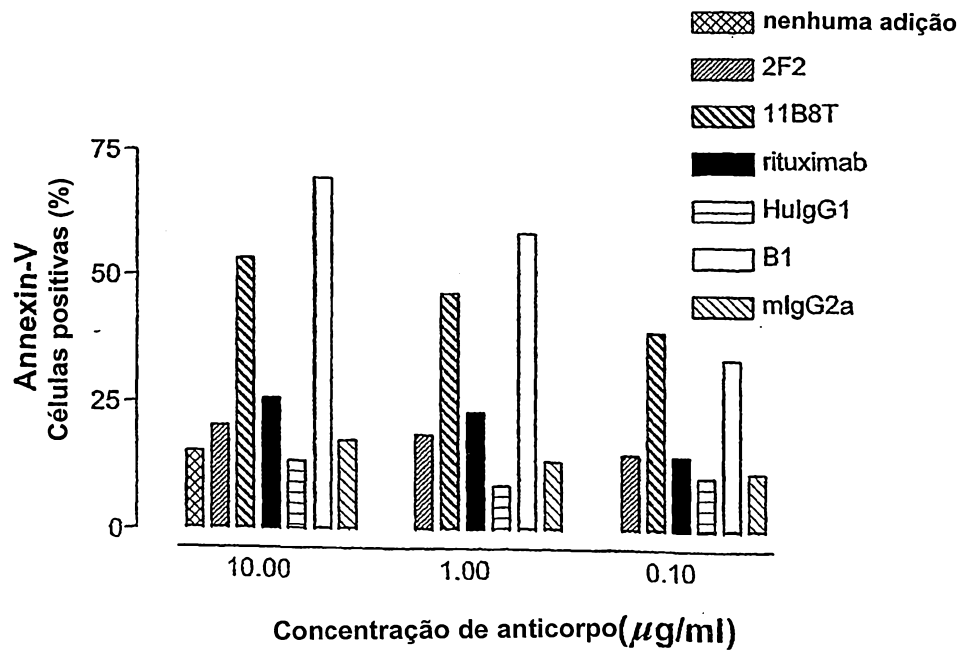
*Fig. 30*

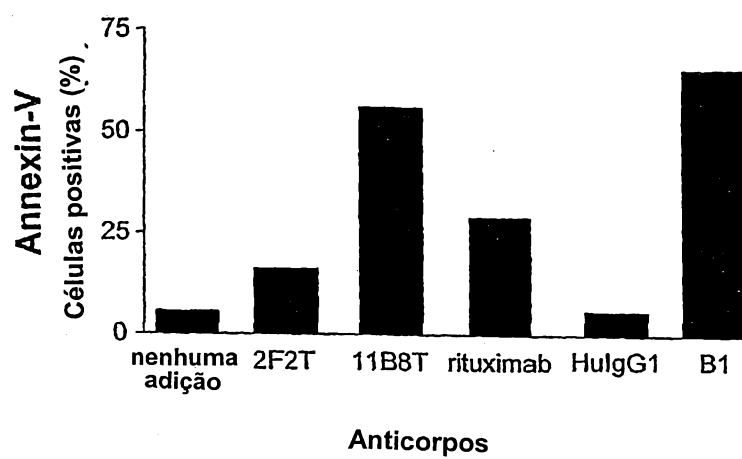
*Fig. 31*

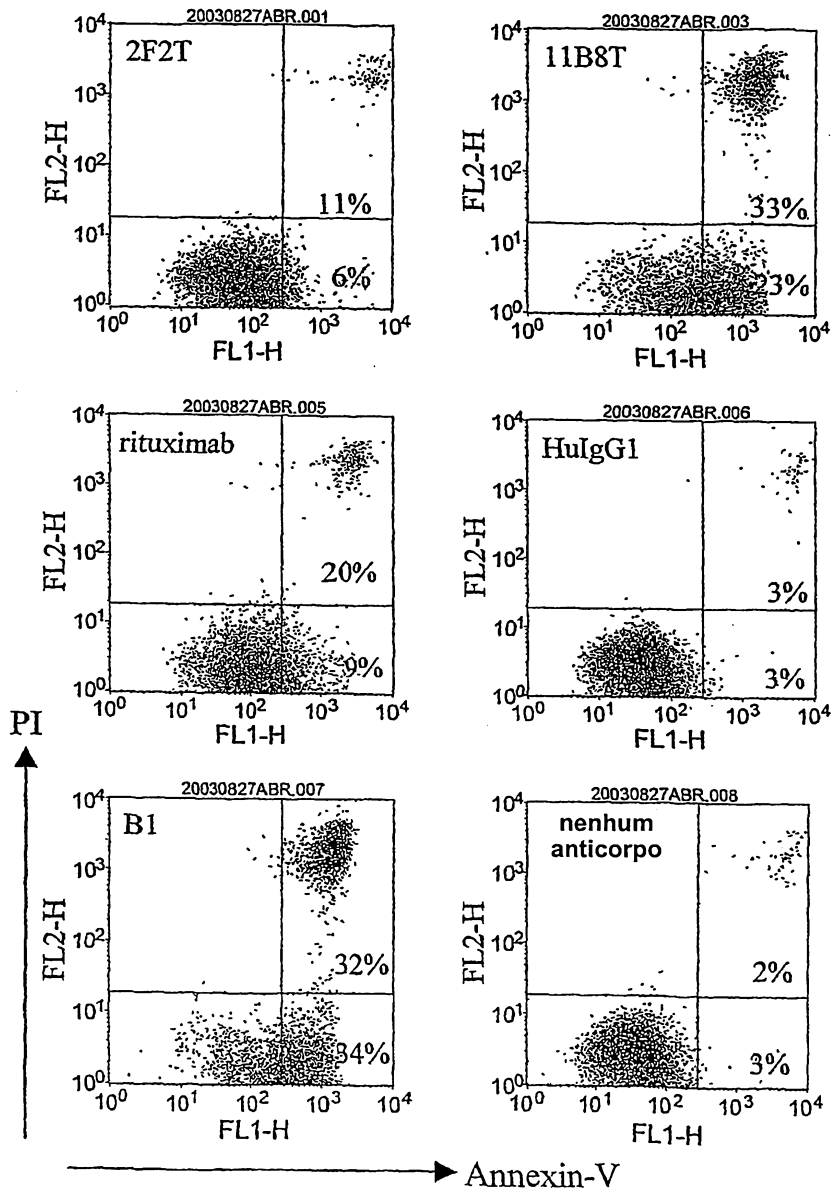
*Fig. 32*

*Fig. 33A**Fig. 33B**Fig. 33C*

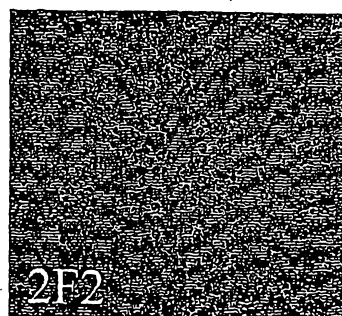
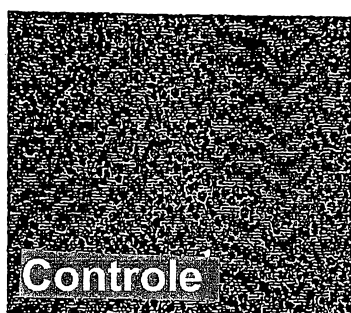
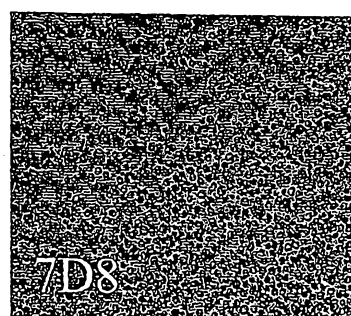
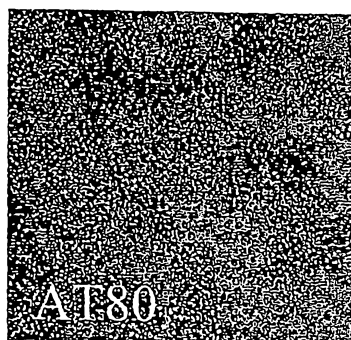
*Fig. 33D**Fig. 33E**Fig. 33F*

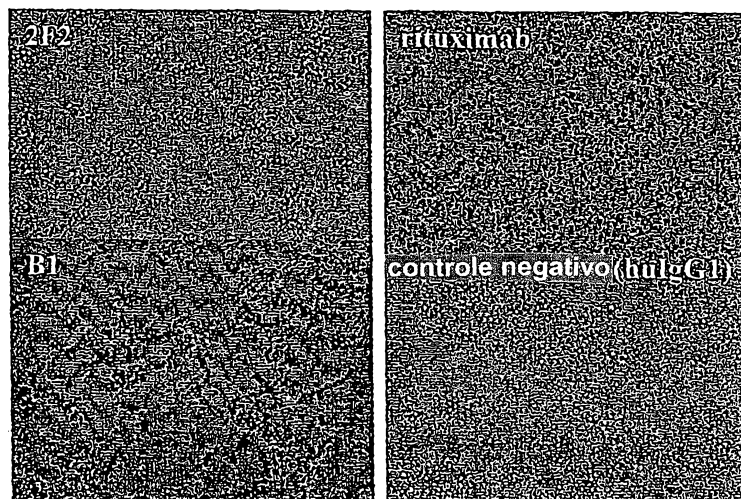
*Fig. 33G**Fig. 34*

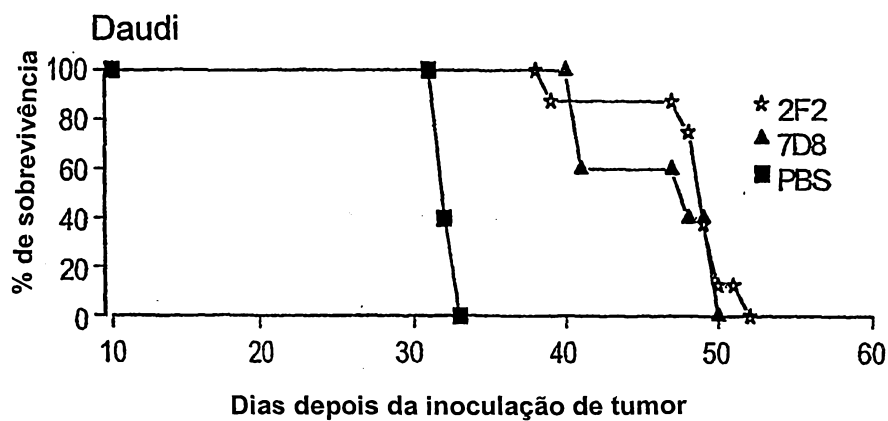
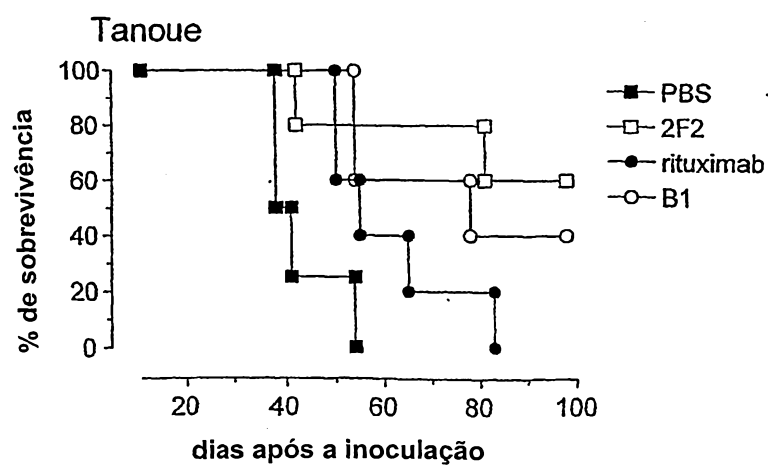
*Fig. 35A*

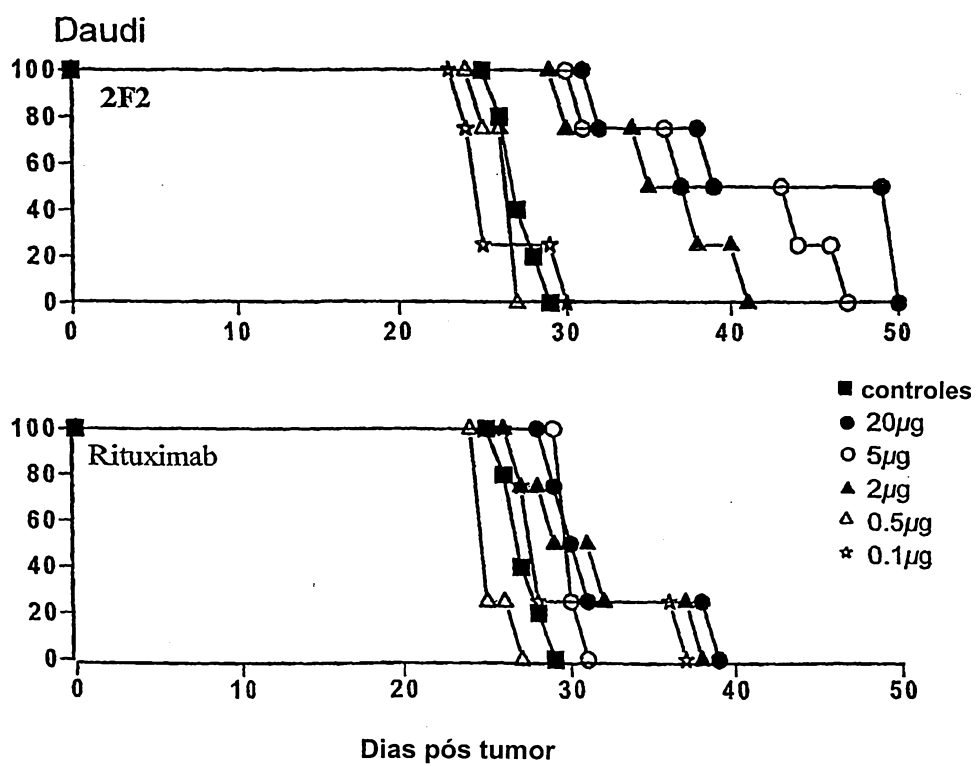
*Fig. 35B*

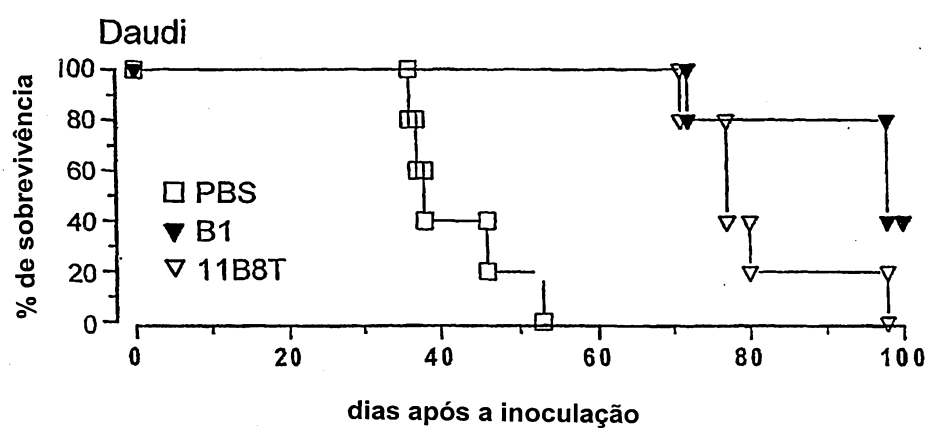
Adesão homotípica de células Ramos

*Fig. 36A**Fig. 36B**Fig. 36C**Fig. 36D**Fig. 36E*

*Fig. 37*

*Fig. 38**Fig. 39*

*Fig. 40*

*Fig. 41*

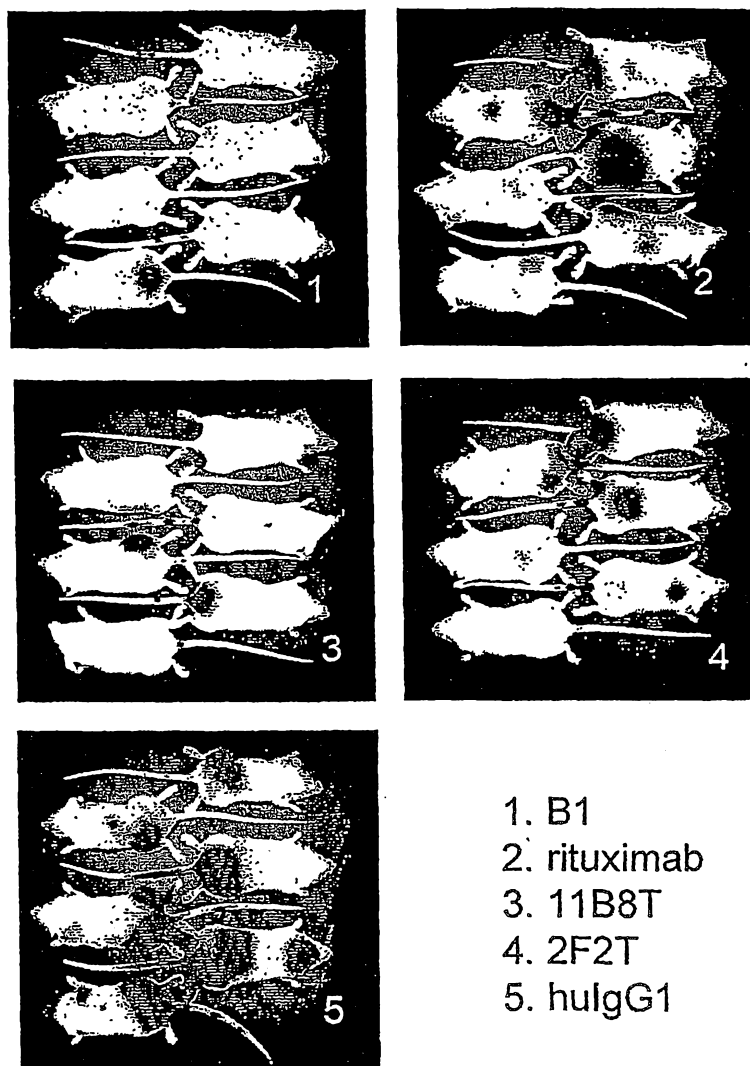
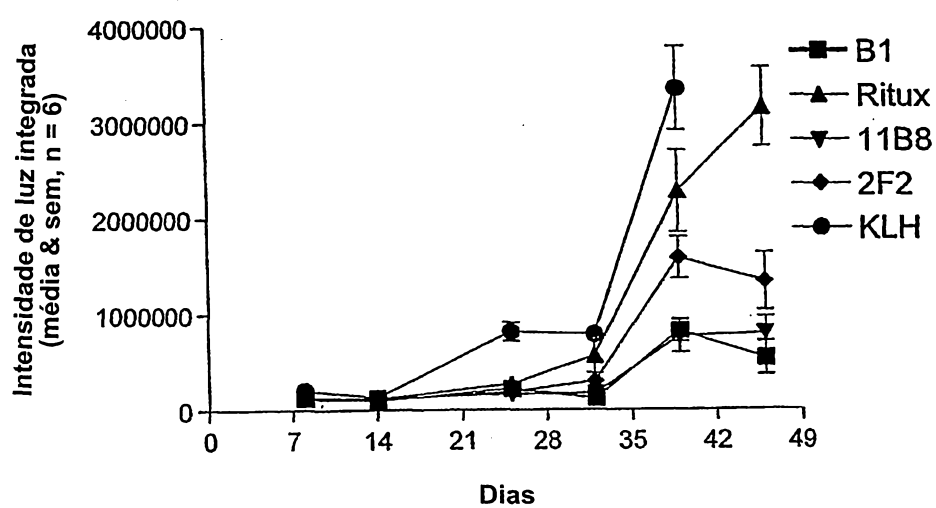
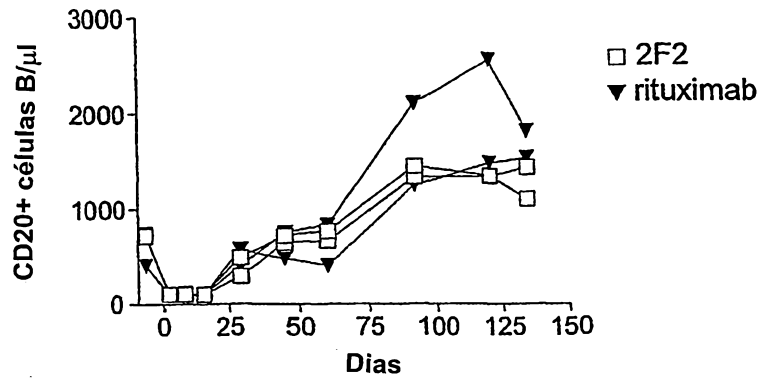
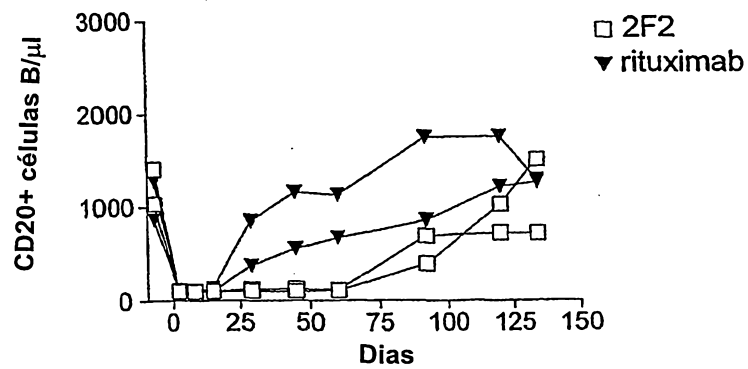
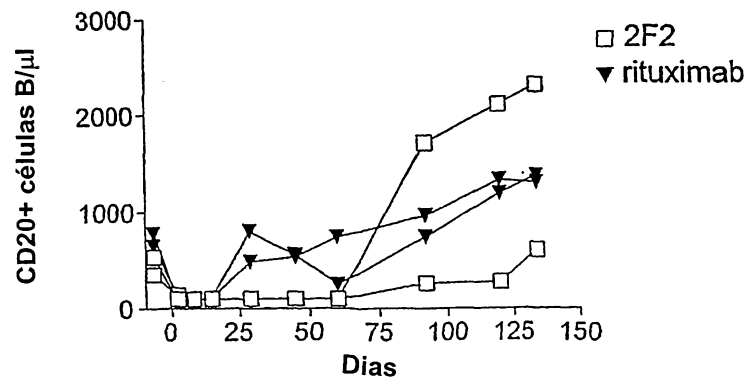
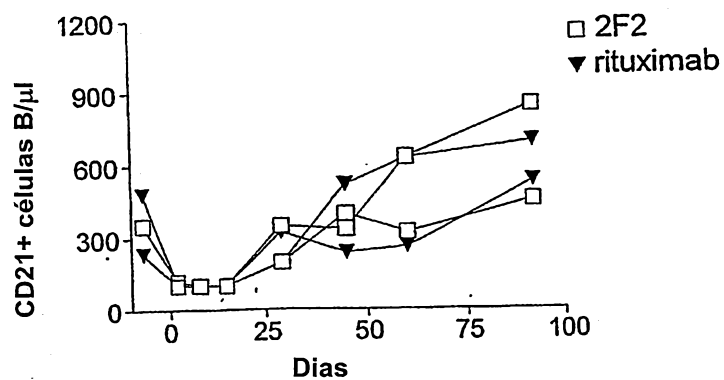
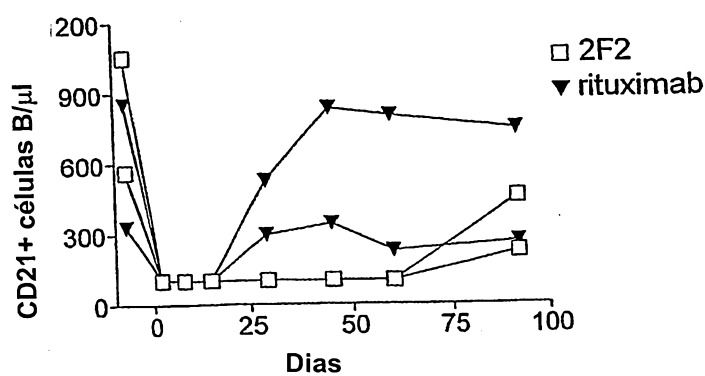
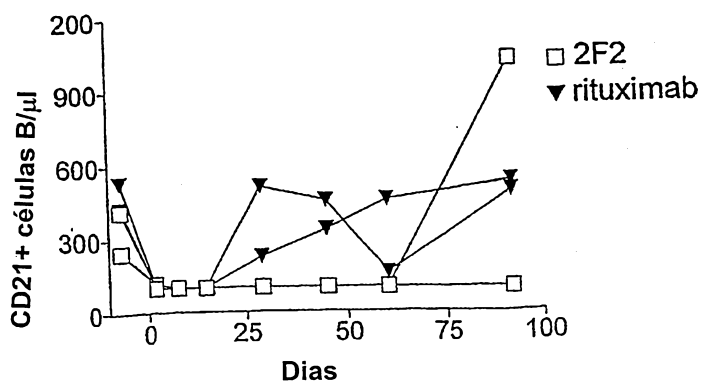
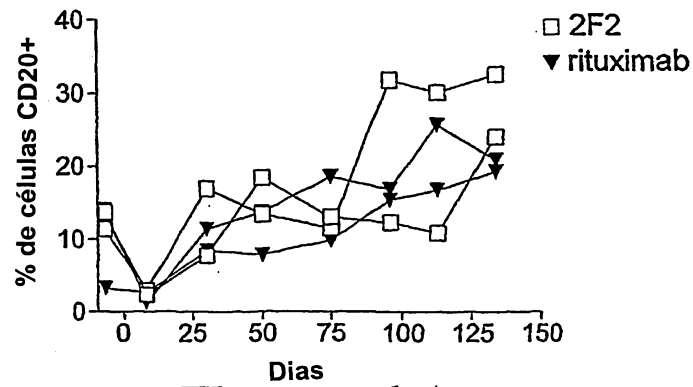
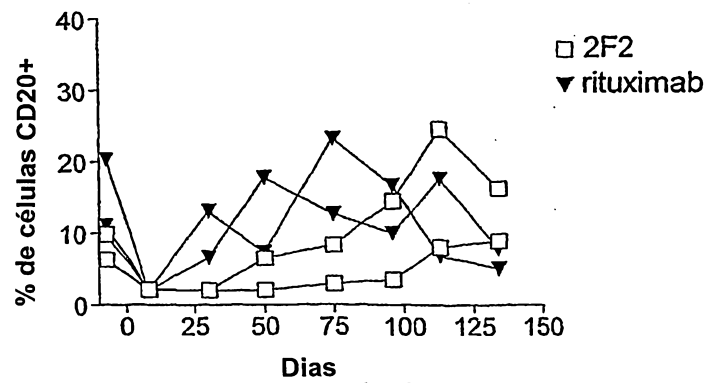
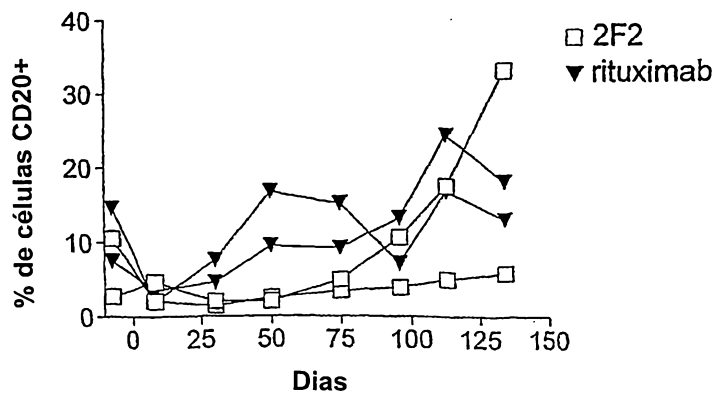


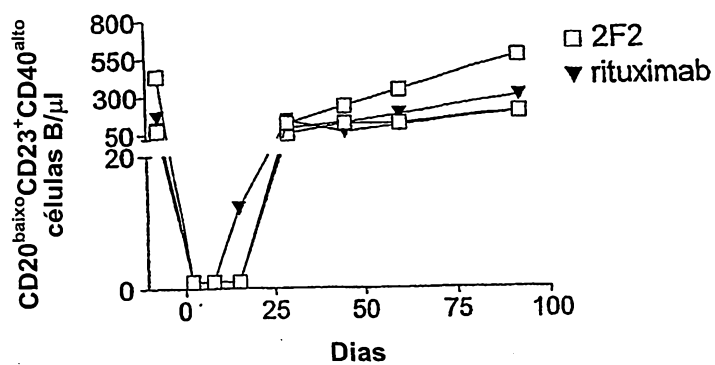
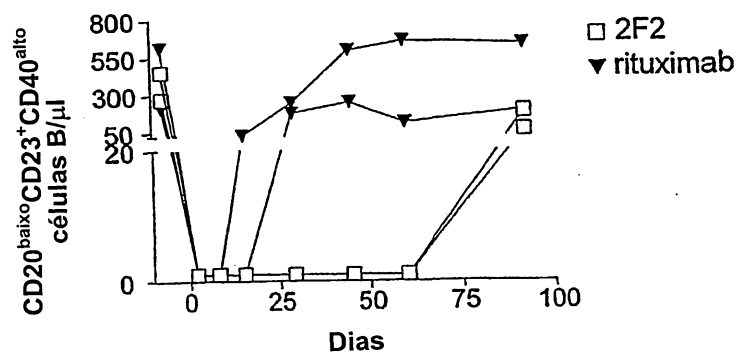
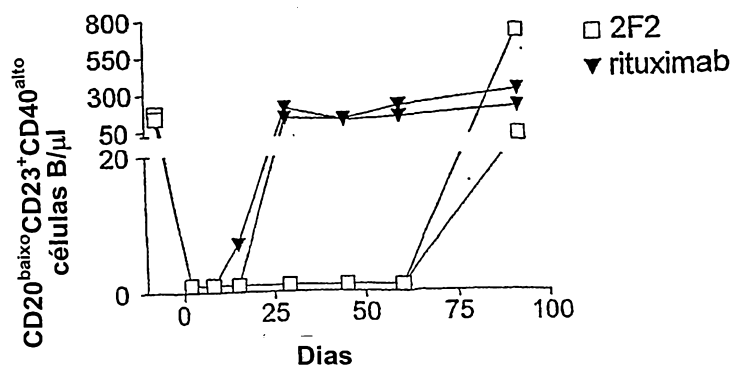
Fig. 42

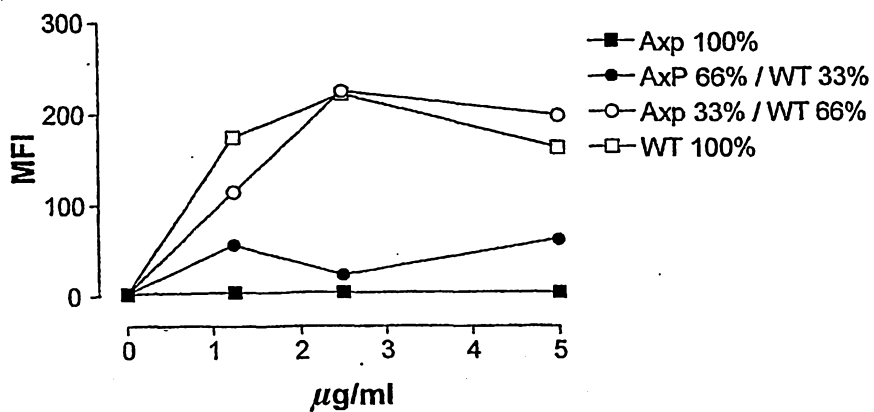
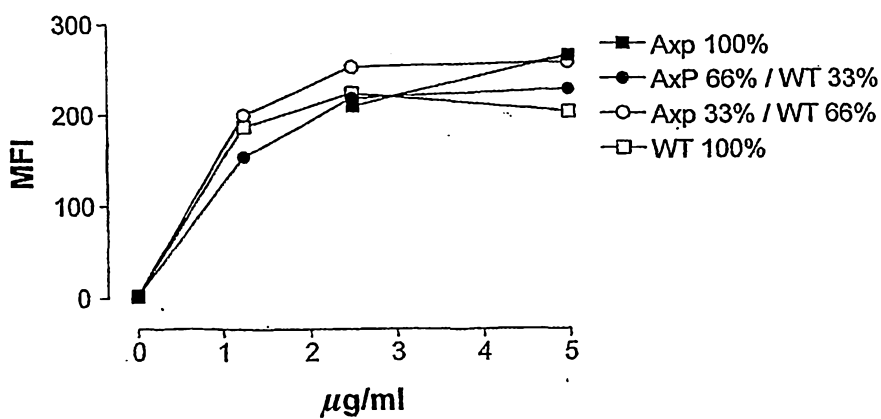
*Fig. 43*

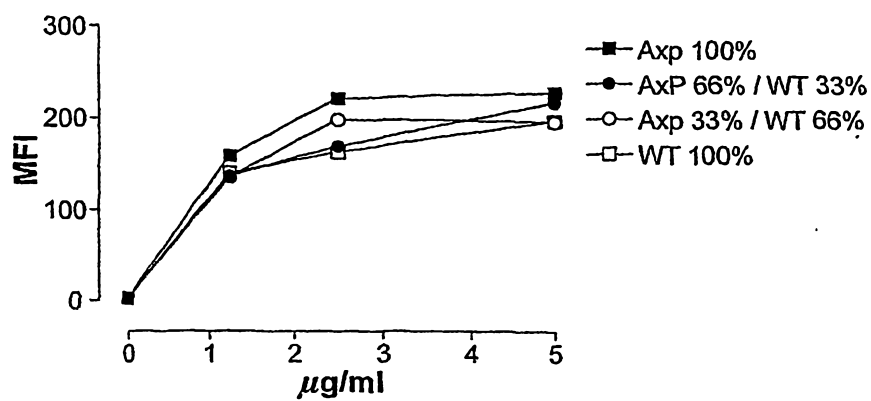
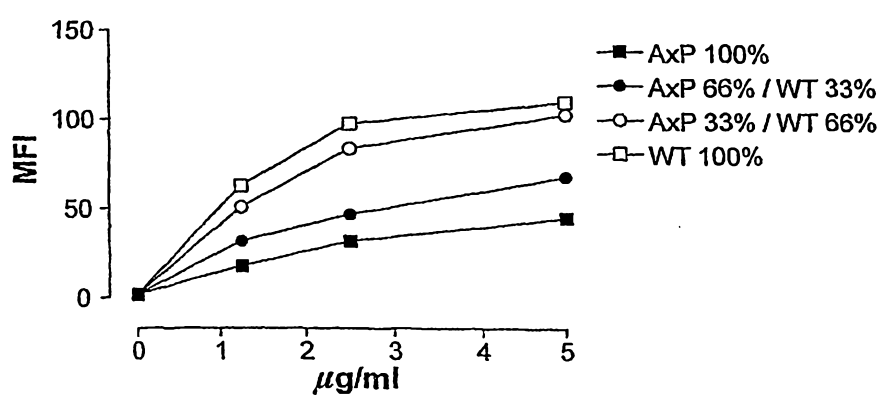
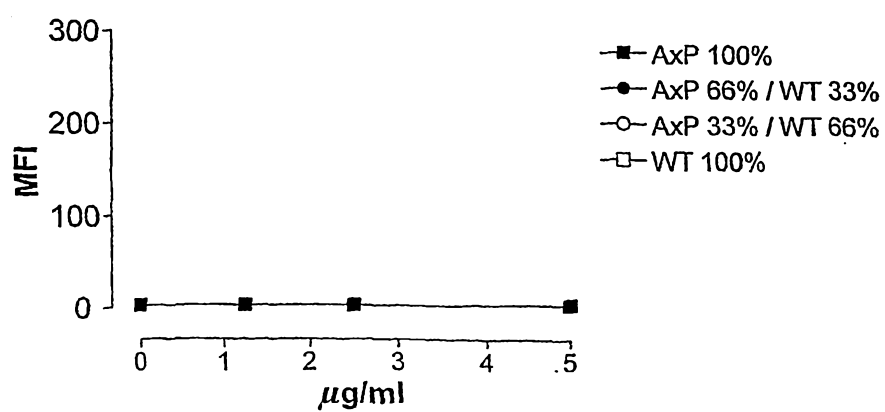
*Fig. 44A**Fig. 44B**Fig. 44C*

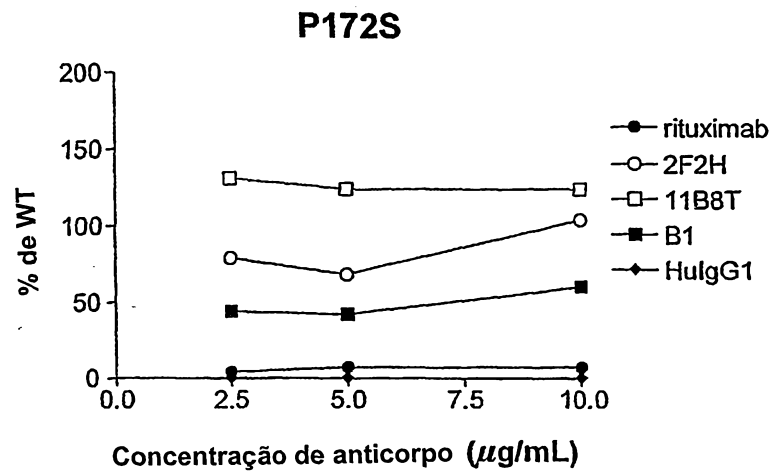
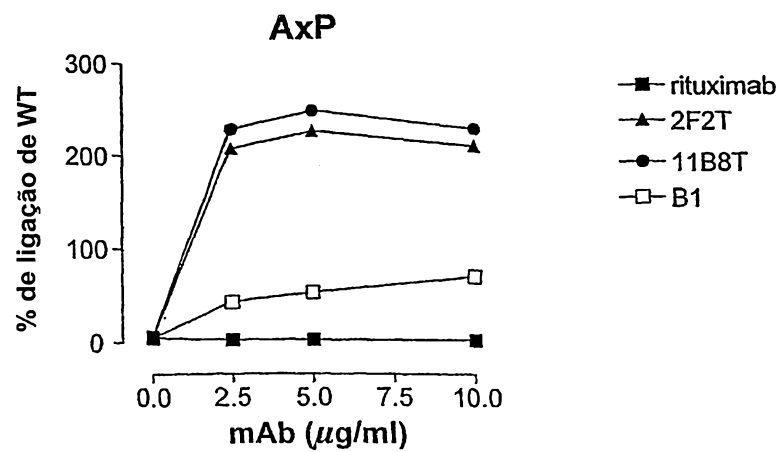
*Fig. 45A**Fig. 45B**Fig. 45C*

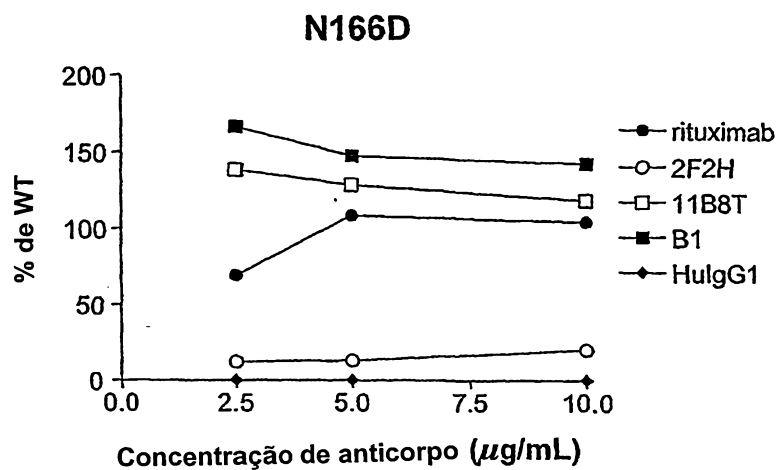
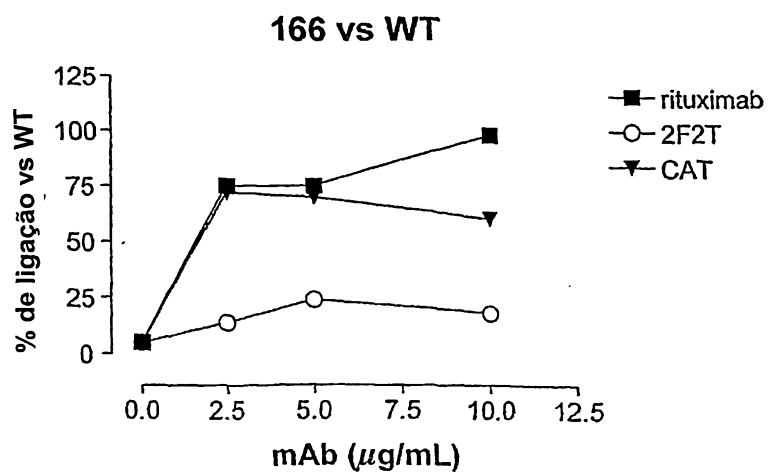
*Fig. 46A**Fig. 46B**Fig. 46C*

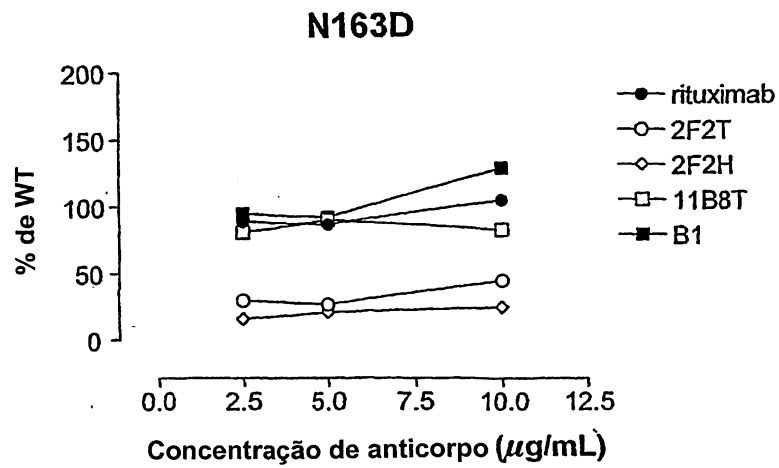
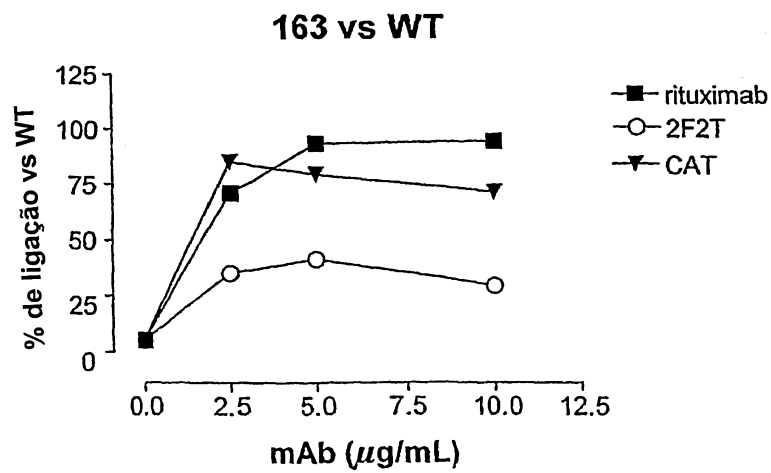
*Fig. 47B**Fig. 47B**Fig. 47C*

*Fig. 48A**Fig. 48B*

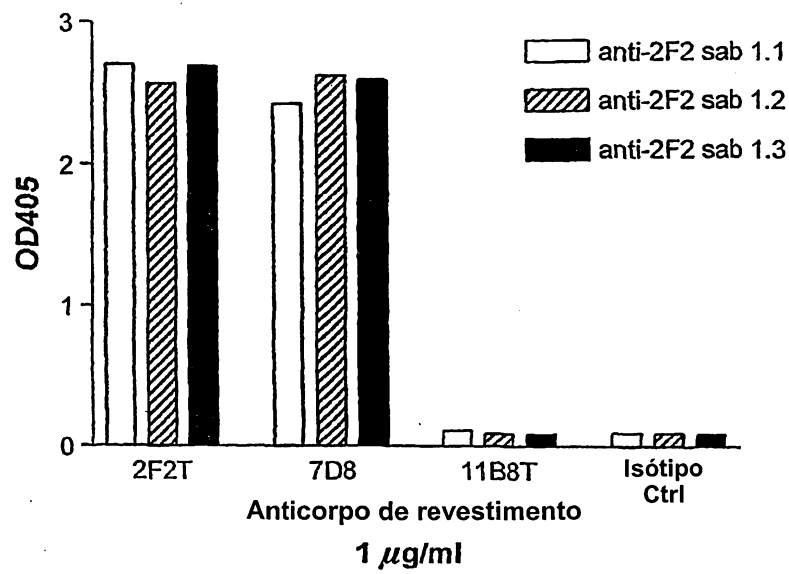
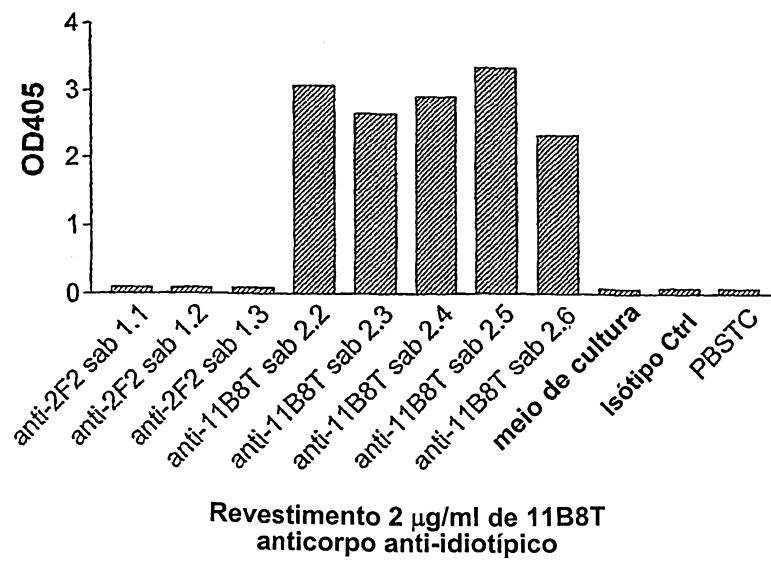
*Fig. 48C**Fig. 48D**Fig. 48E*

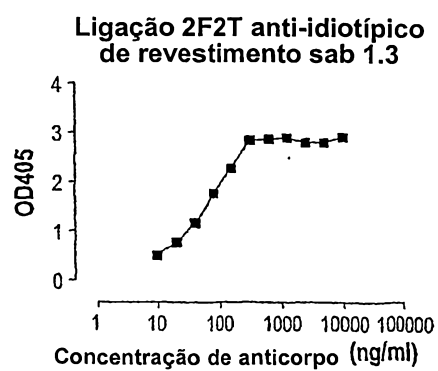
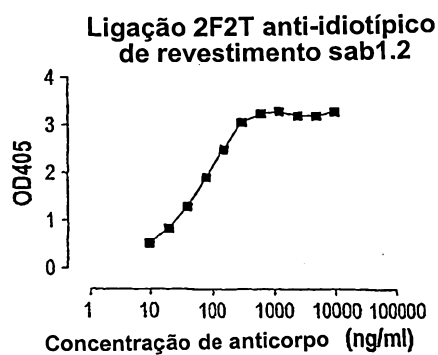
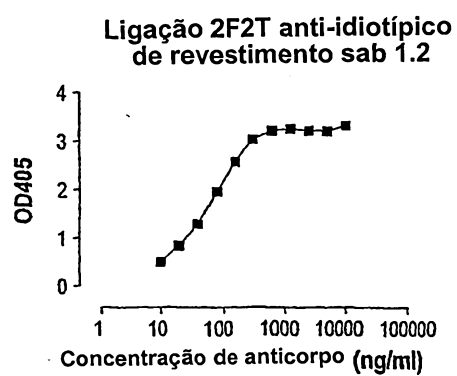
*Fig. 49A.**Fig. 49B*

*Fig. 49C**Fig. 49D*

*Fig. 49E**Fig. 49F*

P 10315295

*Fig. 50**Fig. 51*

*Fig. 52*

1 MFLGLSWIFL LAILKGVQCE VOLVESGGGL VQGRSLRLS CAASGTFND

51 YAMHWVRQAP GKGLEWVSTI SWNSGSIGYA DSVKGRFTIS RDNAKKSLYL

101 QMNSLRAEDT ALYYCAKDIO YGNYYGMDV WGQGTTVTVS S

1 MEAPQQLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRA⁵⁰SVS

51 SYEA⁵⁰WYQOKP GOAPRL⁵⁰LYD ASNRA⁵⁰TGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP

101 EDFAVY⁵⁰CCQ RSNW⁵⁰ETFGQ GTRLEIK

CDR1	CDR2	CDR3

Fig. 53

7 1 0 3 1 5 2 9 5

2F2 VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCCTT TTGGCT ATTTTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAA GTGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CCTGGC AGGTCC
109 CTGAGA CTCTCC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT AATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGAAG GGCCTG GAGTGG GTCICA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTTC ATAGGC TATGCG GACTCT GTGAAG GGCCGA TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAG TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCCTC TCAG

```

2F2VL

```

1  ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTCTCT TTCCCTC CTGCTA CTCGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCTCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCAIC CCAGCC AGGTTT CGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACITG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAC

```

Fig. 54

Tradução de 7D8VH

```

1  MELGLSWIFL LAILKGVQCE VOLVESGGGL VQDRSLRLS CAASGFTFHD
51  YAMHWVRQAP GKGLEWVSTI SMNSGTIGYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
101 OMNSLRAEDT ALYYCAKDTQ YGNYYIGMDY WGQGTVTVS S

```

Tradução de 7D8VL

```

1  MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
51  SYLAWYQOKP GOAPRLLIYD ASNRAIGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP
101 EDFAVYYCQQ FSNWRTTFGQ GTRLEIK

```

☐ CDR1
☐ CDR2
☐ CDR3

Fig. 55

.....

7D8VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAA GTGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CTGAC AGGTCC
109 CTGAGA CTCTCC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT CATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGAAG GGCCTG GAGTGG GTCTCA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTACC ATAGGC TATGGG GACTCT GTGAAG GGCCGA TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAC TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCTCC TCAG

```

7D8VH

```

1  ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTCTTC TTCCTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCTCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT AGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTIGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

Fig. 56

P 1 0 3 1 5 2 9 5

Tradução de VHCD2011B8

1 MELGLSWVEL VAILKGVOCE VOLVQSGGGL VHPGGSRLRLS CTGSGFTTFSY
51 HAMHWVRQAP GKGLEWVSLI GTGGVTYYAD SVKGRFTISR DNVKNSLYLQ
101 MNSLRAEDMA VYYCARDIYGAGSFYDGLYGMDWNGQGTIV TVSS

Tradução de VLCD2011B8

1 MEAPAOQLLFL LLLWLPTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
51 SYLAWYQOKP GOAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSELP
101 EDFAVYYCCQ RSDWPIITFEGG GTKVEIK

CDR1
CDR2
CDR3

Fig. 57

.....

VHCD2011B8

```

1  ATGGAG TTGGGG CTGAGC TGGGTT TTCCTT GTTGCT ATATTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAG GTTCAG CTGGTG CAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAT CCTGGG GGTGCC
109 CTGAGA CTCTCC TGTACA GGTCTT GGATTC ACCCTC AGTTAC CATGCT ATGCAT
163 TGGGTT CGCCAG GCTCCA GGAATA GGCTTG GAATGG GTATCA ATTATT GGGACT
217 GGTGGT GTCACA TACTAT GCAGAC TCCGTG AAGGGC CGATTC ACCATC TCCAGA
271 GACAAT GTCAAG AACTCC TTGTAT CTTCAA ATGAAC AGCCTG AGAGCC GAGGAC
325 ATGGCT GTGTAT TACTGT GCAAGA GATTAC TAAGGT CGGGGG AGTTT TATGAC
379 GGCCTC TACGGT ATGGAC GTCCTG GGCCAA GGGACC ACGGTC ACCGTC TCCTCA
433  G

```

VLCD2011B8

```

1  ATGGAA GCCCCA GCACAG CTTCCT TCCTTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCTCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT AGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC GACTGG CCGCTC ACTTTC GCGGGA GGGACC AAGGTG GAGATC
379  AAC

```

Fig. 58