



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

**(11) PI 0815567-4 B1**



**(22) Data do Depósito: 17/07/2008**

**(45) Data de Concessão: 04/06/2019**

---

**(54) Título:** ANTICORPOS HÍBRIDOS ANTI-ALFA V-INTEGRINA PROJETADOS, PROTEÍNA DE FUSÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

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

**(30) Prioridade Unionista:** 17/07/2007 EP 07 013964.7.

**(73) Titular(es):** MERCK PATENT GESSELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG.

**(72) Inventor(es):** SIMON GOODMAN; DIANE HAHN; FRANCESC MITJANS; JAUME ADAN; KIN-MING LO.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2008005852 de 17/07/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/010290 de 22/01/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 12/01/2010

**(57) Resumo:** ANTICORPOS HÍBRIDOS ANTI-ALFA VINTEGRINA PROJETADOS, PROTEÍNA DE FUSÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA A presente invenção se refere a anticorpos projetados que se ligam especificamente a receptores integrinas, especialmente à subunidade de receptor alfa V integrina. Os anticorpos compreendem os locais de ligação de antígeno (CDRs) de um anticorpo anti-integrina de camundongo conhecido, bem como sequências variáveis de cadeia leve híbrida, sequências variáveis de cadeia pesada mutacionada (Frs) e sequências constantes de cadeia pesada modificadas. Os novos anticorpos têm propriedades imunogênicas e de expressão aperfeiçoadas e induzem excelente atividades antiangiogênico bem como atividades antitumor em humanos em monoterapia, mas também, e acima de tudo, em combinação com outros agentes de inibição de angiogênese e de tumor.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTI-CORPOS HÍBRIDOS ANTI-ALFA V-INTEGRINA PROJETADOS, PROTEÍNA DE FUSÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se refere a anticorpos projetados que se ligam especificamente a receptor integrina, especialmente a subunidade de receptor alfa V integrina. Os anticorpos compreendem locais de ligação de antígeno (CDRs) de um anticorpo anti-integrina de camundongo conhecido, bem como sequências variáveis de cadeia leve híbridas, sequências variáveis de cadeia pesada mutacionadas (Frs) e sequências constantes de cadeia pesada modificadas. Os novos anticorpos têm propriedades imunogênicas e de expressão aperfeiçoadas e induzem excelentes atividades antiangiogênicas, bem como atividades antitumor em humanos em monoterapia, mas também, e acima de tudo, em combinação com outros agentes de angiogênese e de inibição de tumor, tais como cilengitida, cetuximab e agentes quimioterapêuticos.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] O tratamento de câncer permanece um problema maior no cuidado da saúde. Uma estratégia proposta para tratamento de câncer é a inibição de angiogênese e, desse modo, inibição da geração e desenvolvimento de vasos sanguíneos que suprem o tumor com meios de crescimento relevantes. Uma segunda estratégia é direcionar inibição de receptores específicos em superfícies de célula de tumor, tais como a inibição de Her2 por Herceptin® ou inibição de EGFR por cetuximab (Erbix®).

[003] Os inibidores de integrinas são considerados serem agentes antitumores potencialmente úteis porque integrinas são expressos

na neovasculatura do tumor e mediam angiogênese. Em adição, integrinas são expressos em certas células de tumor e podem promover diretamente crescimento e sobrevivência do tumor.

[004] As integrinas não têm atividade enzimática, mas as integrinas capazes de ligarem seus ligantes (integrinas competentes ligantes) são ativadas por ligação às proteínas do ECM. As integrinas por um lado disparam cascatas de quinase intracelulares para modular crescimento e sobrevivência da célula, e, por outro lado, se associam com o citoesqueleto para acionar fixação e locomoção da célula.  $\alpha v\beta 5$  integrina ligam especificamente vitronectina, enquanto  $\alpha v\beta 3$  também liga outras macromoléculas do ECM provisional.  $\alpha v\beta 3$  foi primeiro notado em câncer como um marcador dependente da progressão no melanoma maligno. Ela aumenta o crescimento do melanoma *in vivo* e sobrevivência *in vitro*. Os bloqueadores  $\alpha v\beta 3$  revertem estes efeitos. Subsequentemente,  $\alpha v\beta 3$  foi encontrado em outros tumores incluindo glioblastoma, carcinomas renais, carcinomas ovarianos e outros.  $\alpha v\beta 3$  foi também amplamente sobre-expresso nos ECs em muitas malignidades. *In vitro*, modelos angiogênicos ativados por fatores de crescimento derivados de tumor sobre expressam e requerem  $\alpha v\beta 3$  no crescimento da vasculatura, enquanto o bloqueio de  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$  podem suprimir o fenótipo angiogênico.  $\alpha v\beta 5$  mostrou-se também suportar a neo-vasculatura induzida por alguns fatores de crescimento derivados de tumor, a inibição do  $\alpha v\beta 5$  podendo disparar apoptose de células de tumor.

[005] Os receptores integrina são sobre-expressos em vasos sanguíneos invasivos de tumor, em melanomas e algumas outras malignidades, e modulam resposta celular a fatores de crescimento. O compartimento vascular é um alvo terapêutico promissor porque os tumores sólidos dependem dos vasos sanguíneos para oxigênio, nutrição, detoxificação e a dispersão de metástase que suporta sangue; a

alteração ao fenótipo angiogênico marca uma etapa distinta na indução de malignidade, que é responsável pela intervenção terapêutica; e a vasculatura suporta mudança contínua, ainda células endoteliais têm estabilidade genômica relativa ao tumor, e são menos prováveis a tornarem-se resistentes o fármaco através de mutação.

[006] Um primeiro fármaco anti-integrina cilengitida e é considerada ser um agente antitumor útil (Eskens FA, *et al.* (2003) Eur J Câncer 39:917-26). Contudo, cilengitida é uma molécula pequena que deve ser dosada frequentemente. A estrutura de cilengitida, forma de sal selecionada, por exemplo, são revelados em EP0770622, WO 0015244 e PCT/us07/01446, e são revelados aqui por referência.

[007] Um segundo fármaco anti-integrina é mAb 17E6 de camundongo (EMD 73034), que inibe especificamente a subunidade av integrina de células que suportam receptor integrina humano. O anticorpo IgG1 de camundongo é descrito, por exemplo, por Mitjans *et al.* (1995; J.Cell Sci. 108, 2825) e patentes US 5.985.278 e EP 719 859. AS seqüências de cadeia leve e pesada variáveis completas são representadas em SEQ ID n°s 25 e 26 (Figuras 20 A, B). Murino 17E6 foi gerada de camundongos imunizados com av $\beta$ 3 purificada e imunizada por Sepharose. Linfócitos de baço a partir de camundongos imunizados foram fundidos com células de miolema de murino e um dos clones resultantes de hibridoma produziram anticorpo monoclonal 17E6 (EMD 73034). mAb 17E6 de camundongo é produzido pela linhagem de célula de hibridoma 272-17E6 e depositada sob o número de acesso DSM ACC2160.

[008] 17E6 de camundongo antagoniza interação de integrina com a matriz extracelular (ECM), e perturba a função de células endoteliais e de tumor. Os efeitos primários do anticorpo incluem rompimento da adesão e movimento da célula endotelial (EC), induzindo sua apoptose, e suprimindo a ativação das trajetórias de fator de cres-

cimento. O bloqueio por referido anticorpo suprime diretamente a sobrevivência de ambas as células endoteliais ativadas e algumas células de tumor.

[009] Anticorpos monoclonais tais como 17E6 são geralmente úteis para a inibição de interações proteína-proteína extracelulares, tais como a inibição de interações ligante-receptor. Contudo, anticorpos monoclonais são frequentemente difíceis de expressar e frequentemente provocam uma resposta imune, tal como uma resposta anti-idiotípica, que limita sua eficiência.

[0010] Estes dados e conhecimento principal reunidos até agora suportam a necessidade de desenvolvimento de um anticorpo de 17E6 de camundongo modificado com propriedades aperfeiçoadas que se ligam especificamente a integrinas, podem ser eficientemente expressos, e é relativamente não-imunogênico em humanos como um agente terapêutico em câncer. Tal anticorpo projetado deve ter o potencial de suprimir o desenvolvimento do tumor ambos indiretamente, via a vasculatura do tumor, e diretamente nas próprias células de tumor.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[0011] A invenção se refere a novos anticorpos tendo as características biológicas de anticorpo monoclonal de 17E6 de camundongo (EMD 73034), mas propriedades aperfeiçoadas acima de tudo com relação à imunogenicidade a humanos e satisfazendo a expressão em sistemas de expressão de mamífero em uma produção industrial e escala de manufaturamento.

[0012] A invenção proporciona uns poucos anticorpos projetados tendo sequências modificadas, que reconhecem o mesmo epítipo de receptor como anticorpo de camundongo 17E6, mas mostram imunogenicidade reduzida em humanos e podem ser melhor expresso como o anticorpo não-modificado comparável.

[0013] Deve ser notado que a modificação ou projeto de um anti-

corpo derivado de camundongo de modo a obter imunogenicidade reduzida em humanos é, como uma regra, efetuada por uma perda distinta de expressão e/ou inibição da afinidade. Desse modo, a quimerização ou humanização, de acordo com técnicas-padrão bem-conhecidas, usualmente conduzem a uma diminuição de expressão, ligação de afinidade etc., que podem somente decompor parcialmente por mutações posteriores específicas ou outras medidas. As modificações dentro de uma molécula de proteína respectiva que são simultaneamente bem-sucedidas com relação à imunogenicidade reduzida, alta expressão, e satisfazendo ligação de afinidade, não podem ser prognosticadas. Desse modo, diminuindo-se o número de epítopos de célula T de modo a eliminar ou reduzir uma resposta imune contra o fármaco em um humano como problema primário a ser resolvido, pode conduzir a perda não-tolerável de expressão ou ligação de afinidade, ou ambos, que conduziria a outros problemas a serem resolvidos.

[0014] É, portanto, objetivo da presente invenção proporcionar anticorpos projetados com uma especificidade-alvo definida que conduz a imunogenicidade reduzida, satisfazendo expressão e boa ligação de afinidade. Estas propriedades podem ser obtidas por modificações surpreendentes dentro da molécula-fonte original de camundongo 17E6. Em muitos destes experimentos faz sentido comparar os resultados não diretamente com o anticorpo 17E6 de camundongo, mas com uma versão 17E6 quimérica (contendo regiões constantes humanas). Anticorpos quiméricos bem-sucedidos da técnica, como uma regra, mostram ligação de afinidade suficiente e expressão suficiente, mas induzem frequentemente a uma resposta imunogênica em um indivíduo humano.

[0015] Principalmente, a invenção proporciona anticorpos híbridos antiav-integrina recombinantes projetados com imunogenicidade reduzida ou eliminada em humanos compreendendo

(i) uma região de cadeia leve e pesada CDR derivando de anticorpo antiav-integrina monoclonal de camundongo 17E6;

(ii) uma região de estrutura de cadeia leve que é tomada de anticorpo anti-EGFR monoclonal humanizado 425,

(iii) uma região de estrutura de cadeia pesada derivando de anticorpo antiav-integrina monoclonal de camundongo 17E6, e

(iv) uma região constante de cadeia pesada derivando de IgG humano, e uma região de cadeia leve constante humana.

[0016] O anticorpo monoclonal humanizado 425 (matuzumab) é conhecido, por exemplo, de EP 531 472, e deriva de sua contraparte murino 425 (MAb 425 de camundongo, ATCC HB9629). O anticorpo foi elevado contra a linhagem de célula de carcinoma A431 humana e verificado se ligar a um epítipo de polipeptídeo no domínio externo do receptor de fator de crescimento epidermal humano (EGFR). Ele foi verificado inibir a ligação de fator de crescimento epidermal (EGF) em ambos locais de baixa e alta afinidade EGFR. Matuzumab tem mostrado em ensaios clínicos alta eficiência. As sequências de FR da cadeia leve de matuzumab são representadas em SEQ ID n<sup>os</sup> 12 – 15, conforme especificado abaixo e nas reivindicações.

[0017] A combinação de regiões de estrutura de cadeia pesada modificada (FRs) de anticorpo de camundongo 17E6 anti-integrina com regiões de operação de estrutura de cadeia leve de um anticorpo anti-EGFR humanizado diferentemente específico 425 (matuzumab) tem gerado, à parte de outra modificação – alguns anticorpos com propriedades imunogênicas superiores, que são, além disso, suficientemente expressos em sistemas de expressão de mamífero-padrão. Usando-se a região VL (FRs) de mAb h425 surpreendentemente o nível de expressão é distintamente aumentado, mas, conforme mostrado mais tarde, mutações adicionais tem que ser feitas de modo a aperfeiçoar outras propriedades, acima de tudo, ligação de afinidade.

[0018] Uma outra modificação importante é a substituição de um resíduo de aminoácido dentro da região CDR2 da cadeia pesada de camundongo 17E6. Substituindo-se um resíduo de cisteína por um resíduo de tirosina surpreendentemente a estabilidade da proteína e nível de expressão podem ser distintamente aperfeiçoados pelo menos comparado a uma versão quimérica 17E6.

[0019] Aperfeiçoamentos adicionais na expressão e estabilidade podem ser obtidos pela substituição da região constante de cadeia pesada de IgG1 de camundongo original por um IgG2 humano com uma região de articulação de IgG1 humano modificado. Em uma concretização preferida, referido IgG2 pode ser adicionalmente modificado por substituição de um resíduo de arginina na posição 297 por uma glutamina (N297Q). Esta modificação elimina um local de N-glicosilação e, desse modo, abole ou reduz atividade de ADCC e CDC dos anticorpos a serem projetados. Infelizmente, por esta medida, a imunogenicidade aumenta, aparentemente pela geração de um novo epítipo de célula T. Surpreendentemente, pela substituição de uma fenilalanina por alanina na posição 296, menos imunogenicidade pode ser restaurada.

[0020] De modo a reduzir o número de epítopos de célula T na região de estrutura de cadeia pesada original de camundongo mAb17E6, numerosas mutações foram efetuadas. Em detalhe, mutações em uma, mais ou todas das seguintes posições do anticorpo de camundongo: A9, E13, M20, K38, R40, A72, S76, Q82, G85, T87, S91 e S113 são necessárias para reduzir imunogenicidade.

[0021] Um anticorpo projetado preferido de acordo com a invenção, que mostra melhores valores de propriedades aperfeiçoadas é designado em seguida como "DI-17E6" ou sinonimamente "DI-17E6Y2h(N297Q)" ou "EMD 525797", e tem a seguinte sequência:

(i) sequências de cadeia leve constantes e variáveis (SEQ ID nº 3, Figura 1 C):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYIAWYQQK-  
PGKAPKLLIYYTSKIHS GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIA-  
TYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG-  
TASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS-  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC e

(ii) sequências de cadeia pesada constantes e variáveis  
(SEQ ID nº 4, Figura 1 D):

QVQLQQSGGELAKPGASVKVCKASGYTFSSFWMHWR-  
QAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNEIFRDKATM-  
TTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASFLGRGAMDYWGQG-  
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK-  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSNF-  
GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAG-  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPE VQFNWYVD-  
GVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYK-  
CKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS-  
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS-  
KLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK, no qual  
as sequências sublinhadas representam as regiões variáveis com as  
CDRs (em negrito). A região constante de cadeia leve é capa humana.  
A região constante de cadeia pesada é IgG2 humano com a região ar-  
ticulada de IgG1 modificada **EPKSSDKTHTCPPCP** (SEQ ID nº 40).

[0022] As sequências de DNA correspondentes de DI-17E6 são mostradas nas Figuras 17-19.

[0023] A invenção é também direcionada a anticorpos projetados conforme descritos acima e abaixo que são fundidos diretamente ou via uma molécula articuladora a citocinas, tais como, IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , ou fatores de crescimento. As citocinas de fusão de anticorpo podem ser também usadas em terapia de tumor e/ou doenças relacionadas à angiogênese porque a porção de citocina pode

contribuir para uma citotoxicidade aumentada. As proteínas de fusão de anticorpo, especialmente imunocitoquinas são bem-conhecidas na técnica. Uma proteína de fusão conhecida de acordo com a invenção é DI-17E6-IL2, ou DI-17E6-(L)-.IL2, no qual L é um peptídeo ligador.

[0024] De acordo com a presente invenção, foi mostrado que os anticorpos projetados conforme descritos podem ser usados em composição farmacêuticas para o tratamento de doenças relacionadas à angiogênese e/ou doença relacionada a tumor. Surpreendentemente, os anticorpos de acordo com a invenção induzem um efeito direto no crescimento de tumor que parece ser independente do efeito de anti-tumor indireto causado pelo bloqueio de angiogênese.

[0025] É também objetivo da invenção proporcionar composições farmacêuticas e seu uso compreendendo um segundo agente terapêutico, que é preferivelmente um agente quimioterapêutico, tais como cisplatina, doxorubicina, etc., um inibidor de av-integrina, tais como RGD-peptídeos, por exemplo, cilengitida, ou inibidores de tirosina quinase, especialmente anticorpos anti-erbB1 ou erbB2. Exemplos preferidos são aqui cetuximab (anticorpo monoclonal c225, Erbitux®), matuzumab (anticorpo monoclonal humanizado 425), ou Herceptin® (anticorpo humanizado 4D5).

[0026] De acordo com a invenção, os anticorpos projetados nas referidas composições farmacêuticas conforme aqui revelados podem fortalecer o efeito do segundo agente terapêutico, em muitos casos, por interação sinérgica.

[0027] De acordo com a invenção, a combinação do anticorpo projetado DI-17E6 preferido ou variantes similares com anticorpos anti-EGFR, preferivelmente cetuximab, causam um efeito surpreendente, a saber, o retardo ou prevenção de recrescimento de tecido de tumor após cessamento da administração com o anticorpo projetado, preferivelmente DI-17E6.

[0028] A composição farmacêutica compreendendo um segundo agente terapêutico pode ser também usada como um kit de partes compreendendo, em um primeiro acondicionamento, o anticorpo projetado, preferivelmente DI-17E6, e, em um segundo acondicionamento, um segundo agente terapêutico, por exemplo, um inibidor de angiogênese, um agente quimioterapêutico ou um inibidor de tirosina quinase, tal como um anticorpo anti-EGFR ou anti-Her2. Um segundo agente terapêutico preferido do referido kit é o inibidor de angiogênese cilengitida, ou o anticorpo anti-EGFR cetuximab, ou matuzumab, ou um agente quimioterapêutico.

[0029] Em resumo, a invenção está relacionada ao seguinte:

- Um anticorpo híbrido antiav-integrina recombinante projetado compreendendo

- (i) um região de cadeia leve e pesada CDR derivando de anticorpo antiav-integrina monoclonal de camundongo 17E6;

- (ii) uma região de estrutura de cadeia leve que é tomada a partir de anticorpo anti-EGFR monoclonal humanizado 425;

- (iii) uma região de estrutura de cadeia pesada derivando de anticorpo antiav-integrina monoclonal de camundongo 17E6, e

- (iv) uma região constante de cadeia pesada derivando de IgG humano e uma região de cadeia leve constante humana.

[0030] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual as regiões de cadeia leve CDR, que derivam de anticorpo antiav-integrina monoclonal de camundongo 17E6 são:

CDR1: RASQDISNYLA (SEQ ID nº 5)

CDR2: YTSKIHS (SEQ ID nº 6);

CDR3: QQGNTFPYT (SEQ ID nº 7),

e as regiões de cadeia pesada CDR são:

CDR1: SFWMH (SEQ ID nº 8),

CDR2: YINPRSGYTE (X) NEIFRD, no qual X = C ou Y

(SEQ ID nº 11),

CDR3: FLGRGAMDY(SEQ ID nº 10).

[0031] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual a região CDR2 da cadeia pesada tem a sequência YINPRSGYTEYNEIFRD (SEQ ID nº 9).

[0032] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual a região de estrutura de cadeia leve que deriva de anticorpo anti-EGFR monoclonal humanizado 425, compreende a sequência

FR-1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID nº 12),

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID nº 13)

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYYC (SEQ ID nº 14)

FR-4: FGQGTKVEIK (SEQ ID nº 15).

[0033] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referida região de estrutura de cadeia pesada (FR1 -FR4) derivando de anticorpo de camundongo 17E6 é mutacionada nas posições de resíduo de aminoácido 1-15 para reduzir ou eliminar o número de epítopos de célula T e, desse modo, imunogenicidade em humanos.

[0034] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referida região de estrutura de cadeia pesada é mutacionada em uma, mais ou todas as posições do anticorpo de camundongo: A9, E13, M20, K38, R40, A72, S76, Q82, G85, T87, S91 e S113.

[0035] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referidas posições de resíduo de aminoácido mutacionadas no anticorpo projetado são: A9G, E13K, M20V, K38R, R40A, A72T, S76T, Q82E, G85S, T87R, S91T, S113T.

[0036] Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referida região de estrutura de cadeia pesada compreende as seguintes mutações:

A9G, E13K, M20V, K38R, R40A, A72T, S76T, Q82E, G85S,

T87R, S91T e S113T.

[0037] Um anticorpo híbrido antiav-integrina recombinante projetado compreendendo (i) as regiões de cadeia leve CDR:

CDR1 : RASQDISNYLA (SEQ ID nº 5);

CDR2: YTSKIHS (SEQ ID nº 6);

CDR3: QQGNTFPYT (SEQ ID nº 7),

(ii) as regiões de cadeia pesada CDR:

CDR1: SFWMH (SEQ ID nº 8),

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD (SEQ ID nº 9), e

CDR3: FLGRGAMDY (SEQ ID nº 10);

(iii) as regiões de estrutura de cadeia leve:

FR-1: DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITC (SEQ ID nº 12),

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID nº 13)

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYC (SEQ

ID nº 14)

FR-4: FGQGTEKVEIK (SEQ ID nº 15)

(iv) as regiões de estrutura de cadeia pesada

FR1: QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYTFS (SEQ

ID nº 16)

FR2: WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID nº 17)

FR3: KATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAS

(SEQ ID nº 18)

FR4: WGQGTSVTVSS(SEQ ID nº 19),

no qual uma, mais ou todas das posições em negrito e sublinhadas são mutacionadas de modo a reduzir ou eliminar epítomos de célula T e, desse modo, imunogenicidade em um humano; e

(v) uma região constante de cadeia pesada derivando de IgG humano e uma região de cadeia leve constante humana.

Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referida regiões de estrutura de cadeia pesada são:

FR1: QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFS (SEQ ID nº 20)

FR2: WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID nº 21)

FR3: KATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAS (SEQ ID nº 22)

FR4: WGQGTTVTVSS (SEQ ID nº 23).

- Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual a região constante de cadeia pesada deriva de IgG2, no qual em uma concretização preferida referida região constante de IgG2 compreende uma região articulada de IgG1 modificada.

- Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referida região articulada de IgG1 modificada compreende a sequência EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID nº 24).

- Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual referida região constante de IgG2 é modificada pela substituição de aminoácido N a Q na posição 297 (N297Q).

- Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual resíduo de aminoácido F na posição 296 é substituído por A (F296A) de modo a eliminar um epítipo de célula T gerado pela modificação na posição 297.

- Um anticorpo projetado conforme descrito, no qual a região constante de cadeia leve é capa humana.

- Um anticorpo híbrido antiav-integrina recombinante designado como "DI-17E6" essencialmente consistindo em (i) sequências de cadeia leve variáveis e constantes (SEQ ID nº 3):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYIAWYQQK-  
PGKAPKLLIYYTSKIHS      GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIA-  
TYYCQQGNTFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG-  
 TASWCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS-  
 LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    e



- Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou proteína de fusão de anticorpo conforme especificado acima e abaixo em uma quantidade farmacologicamente efetiva opcionalmente junto com um transportador, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

- Uma composição farmacêutica compreendendo um primeiro e segundo agente terapêutico farmacologicamente efetivo, no qual o primeiro agente é um anticorpo ou proteína de fusão de anticorpo conforme especificado, e o segundo agente é selecionado a partir do grupo consistindo em: um agente quimioterapêutico, um inibidor de angiogênese e um agente antitumor opcionalmente junto com um transportador, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

- Uma composição farmacêutica correspondente, na qual o segundo agente terapêutico é um anticorpo antitumor, especialmente um anticorpo anti-EGFR (erbB1) ou um anti-Her2 (erbB2).

- Uma composição farmacêutica correspondente, no qual o referido segundo agente é inibidor integrina cilengitida, inibidores anti-EGFR anti EGFR mAb c225 (cetuximab, Erbitux®) e mAb h425 (matuzumab), e agentes quimioterapêuticos cisplatina, ou DTIC.

- O uso de um anticorpo projetado ou proteína de fusão de anticorpo conforme especificado para a manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença relacionada à angiogênese e/ou metástase de tumores sólidos ou de tumor.

- O uso de uma composição farmacêutica conforme especificada para manufatura de um medicamento para o tratamento de tumores, no qual referido anticorpo projetado aumenta a eficiência do segundo agente.

- O uso de uma composição farmacêutica conforme especificada para a manufatura de um medicamento para o tratamento de tumores, no qual o segundo agente é um anticorpo anti-EGFR, e refe-

rido anticorpo projetado previne ou retarda o recrescimento após cessamento da administração do anticorpo projetado.

- O uso de acordo com a reivindicação 29, no qual o primeiro agente terapêutico é o anticorpo projetado de acordo com a reivindicação 17 (DI-17E6), e o segundo agente terapêutico é mAb c225 (cetuximab).

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0039] De modo a reduzir o potencial para imunogenicidade no homem, DI-17E6 (EMD 525797) foi produzido por desimunização e engenharia genética da murino 17E6 (EMD 73034).

[0040] A desimunização de um anticorpo de acordo com a invenção significa detecção e remoção de epítopos de célula T humanos a partir do anticorpo de camundongo original. Esta tecnologia é diferente da aproximação de "humanização" que substitui sequências de camundongo com sequências de consenso humanas. A tecnologia de desimunização usada é descrita, por exemplo, na WO 98/52976, WO 00/34317 e WO 02/69232.

[0041] As regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de murino 17E6 são analisadas em silico para remover epítopos de célula auxiliadora-T potencial. As sequências VL e VH di-imunizadas são designadas para reterem aqueles aminoácidos a partir da sequência de murino crítica para ligação, tal como as CDRs.

[0042] Para otimizar a expressão, as regiões de estrutura da cadeia leve foram substituídas por aquelas de um anticorpo humanizado 425. Além disso, a cisteína-60 ímpar na VH, que foi rara entre sequências de VH, foi convertida em tirosina (C60Y) para aperfeiçoar estabilidade de proteína.

[0043] Uma das características de EMD 525797 não é disparar respostas imunes. Para efetuar isto, as regiões constantes da imunoglobulina foram também modificadas como segue. Para a cadeia leve,

a região constante capa humana genômica foi usada. Para a cadeia pesada, as regiões constantes gama-2 (72) genômicas humanas foram usadas, mas a região de articulação com as quatro ligações de disulfeto de cisteína foi substituída por uma região de articulação  $\gamma$ 1 modificada para minimizar mistura de ligação de disulfeto e aperfeiçoar expressão. Uma mutação de Asn-297 no domínio de CH2 para Gin (N297Q) foi introduzida para remover o sinal de N-glicosilação: a resultante de-glicosilação anula as funções efetadoras e prolonga meia vida do soro do anticorpo.

[0044] Finalmente, Phe-296 foi mutacionado para Ala, que removeu os epítomos de célula T potencial criados pela mutação N297Q.

[0045] O anticorpo DI-17E6 preferido obtido pelo método descrito brevemente acima (estrutura esquemática é representada na Figura 16, tem as seguintes propriedades):

[0046] DI-17E6 mostra potência e seletividade no receptor isolado e nível celular (por exemplo, ligação de receptor, adesão de célula e estudos de migração de célula).

[0047] DI-17E6 mostra atividade de inibição de crescimento de tumor *in vitro* e em modelos de animal (por exemplo, camundongo sem pele de tumor experimental, camundongo de SCID/quimera de pele humana).

[0048] DI-17E6 mostra atividade antiangiogênica em modelos de animal (por exemplo, camundongo de SCID/quimera de pele humana, tampão de Matrigel em macacos).

[0049] DI-17E6 inibe seletivamente a ligação de proteínas de matriz extracelular (ECM) para receptores av-integrina e bloqueia adesão de célula mediada por av-integrina, fixação e migração. Uma vez que destaque da célula é induzido, dois eventos adicionais ocorrem: as trajetórias de ativação celular são bloqueadas, e av-integrina é internalizado na cultura de tecido. A ligação de fibrinogênio receptor de pla-

queta GPIIb/IIIa e agregação de plaqueta não são afetadas, e EMD dispensa nem citotoxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC), nem citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

[0050] DI-17E6 (EMD 525797) exibe uma especificidade de espécie estreita e somente av-integrinas de humanos e macacos são reconhecidos. O crescimento de melanoma deficiente de av-integrina humano e uma resposta de crescimento vascular foram inibidos pelo EMD 525797 em pele humana enxertada em camundongos de SCID. A administração sistêmica de EMD 525797 em macacos saudáveis bloqueia angiogênese provocada por implante subcutâneo de fatores de crescimento angiogênicos contendo tampões similares ao Fator de crescimento de Fibroblasto básico (bFGF). EMD 525797 tem também demonstrado atividade de antitumor direta em modelos de xenoinxerto de modelos de tumores humanos que expressam av $\beta$ 3-integrina, incluindo alguns melanomas. Na terapia de combinação, estudos de atividade de EMD 525797 sinergizam bem com fármacos quimioterapêuticos que permitem usar concentrações menos tóxicas, inferiores, de quimioterapêuticos-padrão, e ainda permanecendo efetivos em um ajuste similar a clínico. Estes experimentos foram somente capazes de demonstrar a atividade antitumor potencial de EMD 525797, porque endotélio vascular de murino não expressa a ocv integrina alvo e não são, portanto, reconhecidos pelo anticorpo.

[0051] Os dados de um estudo de toxicologia de 4 semanas não revelam quaisquer efeitos relacionados a tratamento de DI-25 17E6 nas observações clínicas, peso corpóreo e consumo de alimento, ECG, temperatura corpórea, taxa respiratória, patologia clínica (hematologia, química de soro), análise de urina, peso de órgão, macroscópico e histopatologia.

[0052] Baseado nestes dados, as doses de 10, 33 e 100 mg EMD 525797/kg de peso corpóreo/dia, administradas uma vez semanalmen-

te por 4 semanas por infusão intravenosa (1 hora), foram consideradas serem bem toleradas e sob as condições de estudos. O anticorpo não é oralmente ativo, mas tem sido bem-sucedidamente administrado i.v., e por rotas i.p. em estudos de animal em que eles foram mostrados inibirem a angiogênese e crescimento de vários tumores experimentais diferentes.

[0053] Um teste de classificação bacteriana investigando o potencial mutagênico de EMD 525797 mostrou que EMD 525797 não é mutagênico. Nenhum alerta de farmacologia humano de EMD 525797 foi observado em estudos de toxicidade de dose repetidos em macaco cynomolgus.

[0054] EMD 525797 tem um peso molecular teórico de 145.208Da, que foi verificado experimentalmente via análise de MALDI-TOF-MS e LC-ESI-Q-TOF MS. O ponto isoelétrico varia de 7,35 a 8,15 com uma média de 7,75. O coeficiente de extinção é 1,42.

[0055] EMD 525797 inibe adesão de célula endotelial humana a vitronectina com um EC50 de aproximadamente 10 nM. EMD 525797 bloqueia adesões de célula de tumor mediadas por av-integrinas com um EC50 variando de 0,1 a 50 nM. A migração induzida por VEGF de células endoteliais humanas em vitronectina é também bloqueada por EMD 525797 com um EC50 ao redor de 50 nM. Similarmente, proliferação e sobrevivência de células endoteliais humanas colocadas em ligantes av-integrina é também bloqueada por EMD 525797.

[0056] EMD 525797 tem como alvo av-integrinas endoteliais e rompem formação de vaso. Ele inibe especialmente integrinas av3 e av5 e bloqueiam comportamento de célula mediado por ctv-integrina, incluindo fixação e migração. Alfa-v integrina e trajetórias de sinalização de fator de crescimento interagem, de modo que ligação de EMD 525797 pode também romper diferenciação, proliferação, e sobrevivência. Em adição a seu efeito antiangiogênico, EMD 525797 eviden-

temente promove apoptose como um efeito de antitumor direto no alvo apresentando células malignas. EMD 525797 pode bloquear fixação de célula, induzir fixação de célula, bloquear migração, proliferação e sobrevivência em ligantes av-integrina.

[0057] DI-17E6 é a primeira proteína di-imunizada para qual dados de imunogenicidade em humanos são disponíveis: Em um respectivo ensaio clínico, anticorpos anti-DI-17E6 não foram detectados em doses acima de 500 mg, que é uma dose teoricamente efetiva comum para anticorpos. Em comparação, anticorpos antifármaco podem ser detectados em ensaios de animal em doses correspondentemente calculadas. Em geral, o comportamento imune de DI-17E6 é considerado mais complexo: inibição de 17E6 para av promoverá entendimento em células dendríticas. A ligação de FcR por 17E6 parece ser eliminada. A ligação de 17E6 a receptor de integrina inibirá provavelmente um mecanismo imunossupressivo natural. Desse modo, os resultados obtidos pelos anticorpos projetados, preferivelmente, DI-17E6, não são esperados em qualquer caso, e são surpreendentes.

[0058] DI-17E6 tem uma ligação de afinidade para o receptor avB integrina que é 17E6 quimérico similar compreendendo as mesmas regiões constantes como DI-17E6. Surpreendentemente, uma mutação do anticorpo que compreende já as regiões de estrutura variável de mAb 425 humanizado, mas ainda a região de VH original de anticorpo 17E6 de camundongo, não se ligam a receptor integrina.

[0059] DI-17E6 é bem expresso por células NS0 e outras linhagens de célula de mamíferos. Interessantemente a mutação que não mostra ligação de afinidade a integrina, conforme descrito acima, mostra a mesma taxa de expressão favorável. Estes e resultados similares mostram que prognóstico das três propriedades desejadas: imunogenicidade reduzida, altos níveis de expressão e satisfação de ligação de afinidade, não é possível.

[0060] Etapas de angiogênese *in vitro* e *in vivo* são perturbadas por DI-17E6, como é crescimento de tumor de melanoma. DI-17E6 pode aumentar a atividade de terapias baseada em fármaco citotóxico, conduzindo a mais atividade antitumor *in vivo*.

[0061] DI-17E6 causa o despolimerização de adesões focais dependentes de  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$ . Estes complexos de sinalização se juntam após ligação de integrina. Eles organizam comunicação com crescimento, sobrevivência e trajetórias de motilidade, e sua destruição pode disparar apoptose.

[0062] Desse modo, DI-17E6 usa uma combinação de efeitos mecanotóxicos e bioquímicos para efeitos que afetam endotélio e aumentam o estresse nas células de tumor.

[0063] DI-17E6 exerce suas atividades biológicas *in vivo* via os efeitos em pelo menos dois compartimentos de célula diferentes dentro do tumor: para as próprias células de tumor, e para as células endoteliais de tumor angiogenicamente ativadas. A fixação de célula endotelial e de tumor mediada por  $\alpha v\beta 3$  ou  $\alpha v\beta 5$  é rompida por DI-17E6. ECs na cultura migra sobre ECM provisional, e esta migração é rompida por DI-17E6. As mudanças morfogenéticas envolvidas na formação de vasos sanguíneos são complexas, mas podem ser modeladas *in vitro* em ensaios de migração de célula endotelial humana onde DI-17E6 pode bloquear este processo. Ele também bloqueia angiogênese quando administrado sistemicamente *in vivo* na pele humana-modelo quimera de camundongos de SCID, e no modelo de tampão matrigel em macacos. Isto sugere que DI-17E6 afeta endotélio angiogênico. Evidência indireta para antiangiogênese é apresentada abaixo. Dependendo de se VEGFA ou FGF2 é o indutor, a angiogênese disparada é dependente de  $\alpha v\beta 5$  ou em  $\alpha v\beta 3$ . Desde que DI-17E6 bloqueia ambos  $\alpha v$ -integrinas, ele pode bloquear ambos as trajetórias. Embora DI-17E6 é pensado de como principalmente tendo como alvo ECs, ele

pode também inibir crescimento e sobrevivência das próprias células de tumor. Por enquanto, isto tem sido somente demonstrado para tumores expressando  $\alpha v\beta 3$ .

[0064] As linhagens de célula de indicações de tumor diferentes (melanoma, ovariano, renal, cólon, seio, e pulmão) têm seu crescimento afetado quando tratadas com DI-17E6 *in vitro*. A atividade de DI-17E6 para induzir antiproliferação varia nas linhagens de células diferentes, e isto pode ser devido a ambos o antecedente genético de cada linhagem de célula e o nível de expressão de  $\alpha v$ -integrina por estas linhagens de célula.

[0065] DI-17E6 pode inibir o crescimento de tumores de xenoinxerto em camundongos. Ele também mostra efeitos sinérgicos em combinação com reagentes quimioterapêuticos. Estes efeitos são dependentes do contexto do tumor, e outras condições (por exemplo, *in vitro/in vivo*), mas eficiência foi observada em localizações subcutâneas e ortópicas similares a pâncreas (ver Exemplos)).

[0066] Em ligantes competentes de tumores sólidos,  $\alpha v\beta 3$  é frequentemente sobre expresso na vasculatura invasiva de tumor e também em alguns tumores humanos, incluindo melanomas, carcinomas renais, tumores de cérebro. Esta expressão é acompanhada pela deposição de ligantes de  $\alpha v\beta 3$ , similares a vitronectina, fator de von Willebrand e fibrinogênio, e pela síntese anômala de tais proteínas. Por exemplo, vitronectina, principalmente produzida no fígado, é expressa em alguns tumores. Em adultos saudáveis vitronectina e fibrinogênio estão em uma forma inativa que suporta sangue, mas na ativação (por exemplo, em pacientes com tumor) eles suportam mudança conformacional e depósito no subendotélio ECM. Desse modo, DI-17E6-alvos são expressos ambos por vasos invasivos de tumor e por alguns tumores, que também expressam receptor de vitronectina.

[0067] O crescimento subcutâneo de  $\alpha v\beta 3$ -que expressa células

de melanoma é suprimido por EMD 525797 em doses diferentes, em um modelo quimérico de camundongo de SCID de pele, onde melanomas humanos carecendo de alfa-v integrinas foram vascularizados por ECs humanos, EMD 525797 também inibe crescimento de tumor, indicando seu efeito antiangiogênico.

[0068] Além disso, em um modelo livre de tumor em macacos, onde angiogênese é induzida pelo fator de crescimento angiogênico bFGF, DI-17E6 também bloqueia o fator de crescimento que induz angiogênese. Baseado nas investigações *in vivo* e de acordo com o plasma experimental através de concentrações identificadas em vários PK/PD em estudos *in vivo*, administrações de EMD 525797 em ensaios clínicos incluem dosagem para alcançar o plasma através de concentrações variando de 10 a 500 ug/ml.

[0069] Se aplicado a modelos de camundongos de xenografia de melanoma (M21, MeWo ou CAKI-1) DI-17E6 causa em doses inferiores (ca. 30mg/Kg) um efeito de regressão de tumor leve, pelo que o efeito é aumentar consideravelmente se doses mais altas (500ul/ml) são administradas.

[0070] Deve ser notado que as propriedades biológicas básicas e terapêuticas conforme especificado para DI-17E6 são também aplicáveis a outras variantes de DI-17E6 conforme especificado neste pedido.

#### Terapia de combinação

[0071] As células endoteliais proliferam e invadem o ambiente do tumor em resposta a citocinas solúveis e a fatores de crescimento secretados pelo tumor. Tais células endoteliais são um alvo adequado para terapia, conforme foi recentemente validado em pacientes de câncer humano. Os alfa-v integrinas expressam *de novo* por tal endotélio invasivo de tumor, suportam sua sobrevivência no ambiente estranho da matriz extracelular transicional, e a inibição destas integrinas

pode ter um efeito angiogênico.

[0072] Desse modo, alfa-v-beta 3 ou av integrina de terapia alvo apresenta um ajuste ideal para combinar o anticorpo da presente invenção com quimioterapêuticos, outros inibidores de integrina ou agentes de bloqueio de receptor de tumor em composições farmacêuticas e kit-de-partes para uso em terapia de combinação de câncer.

[0073] Surpreendentemente foi verificado que o efeito antitumor direto pode ser aumentado pela combinação de um anticorpo projetado de acordo com a invenção, preferivelmente DI-17E6, com agentes antitumores adicionais, especialmente inibidores de tirosina quinase, preferivelmente anticorpos anti-erbBI(EGFR) e anti-erbB2(Her2). Terapias de antitumor têm como alvo o próprio tecido de tumor pelo bloqueio de receptores específicos de tumor, e, desse modo, previnem o crescimento do tumor, ou promovem o encolhimento de tumor.

[0074] De acordo com a invenção pode ser demonstrado que alguns quimioterapêuticos causam, em combinação com um anticorpo projetado de acordo com a invenção, preferivelmente DI-17E6, um efeito aditivo somente, pelo que em outros experimentos usando outros quimioterapêuticos (por exemplo, Dacarbazine, DTIC), efeitos de sinergia podem ser observados. Além disso, os resultados dependem do sistema usado, por exemplo, se um sistema *in vivo* ou *in vitro* foi tomado.

[0075] Um resultado importante a partir de experimentos de combinação é que o uso combinado de preferivelmente DI-17E6 e cilengitida, um peptídeo cíclico RGD e inibidor de integrina (ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), mostra efeitos sinérgicos na regressão de crescimento de tumor *in vitro*, bem como *in vivo*.

[0076] Efeitos sinérgicos similares na redução de crescimento de tumor podem ser obtidos se DI-17E6 é combinado com cetuximab (Erbix®). Erbitux (cetuximab) é um anticorpo quimérico de camun-

dongo/monoclonal humano (MAb) de subclasse IgG1 que tem como alvo o receptor de fator de crescimento epidermal humano (EGFR). As linhagens de célula de carcinoma de célula renal (RCC) diferentes expressam o EGFR. Erbitux é produto comercializado e aprovado para várias indicações de tumor.

[0077] Em todos os casos de sinergia, pode ser concluído a partir dos resultados que o anticorpo projetado DI-17E6 fortalece o efeito antitumor do segundo agente usado na combinação.

[0078] De acordo com a invenção, DI-17E6 causa, quando combinado com cetuximab, uma diminuição constante no tamanho/crescimento do tumor que pode ser observada por um período mais longo (ca. 40 dias) mesmo se administração de fármacos é cessada. Este não é o caso se cetuximab é administrado em mono terapia.

[0079] Os anticorpos projetados de acordo com a invenção podem ser administrados a um paciente em necessidade destes antes, após ou simultâneo com o segundo agente terapêutico.

[0080] O agente quimioterapêutico usado em combinação com qualquer anticorpo projetado de acordo com a invenção pode ser, por exemplo, metotrexato, vincristina, adriamicin, cisplatina, cloroetilnitrosouréias não contendo açúcar, 5-fluorouracil, mitomicin C, bleomicin, doxorubicina, dacarbazina, taxoi, fragilina, Megiamina GLA, vairubicin, carmustaina, UFT(Tegafur/Uracil), ZD 9331, Taxotere/Decetaxel, Fluorouracil (5-FU), vinblastina, e outros compostos desta classe.

[0081] As composições terapêuticas ou composições de DI17E6 da invenção com ou sem um segundo agente terapêutico podem também serem usadas em combinação com outras estratégias anticâncer, e tais terapias de combinação são efetivas na inibição e/ou eliminação de crescimento de tumor e metástase. Os métodos da presente invenção podem vantajosamente serem usados com outras modalidades de

tratamento, incluindo, sem limitação, terapia de radiação, cirurgia, terapia de gene e quimioterapia.

[0082] Surpreendentemente foi verificado que o efeito antiangiogênico pode ser aumentado por combinação de um anticorpo de acordo com a invenção com tratamento com inibidores de angiogênese adicionais. A terapia antiangiogênica tem como alvo a vasculatura do tumor e previne o crescimento do tumor além de um certo tamanho, desse modo, na segunda concretização preferida do medicamento secundário é um inibidor de angiogênese preferivelmente selecionado da seguinte lista:

[0083] O inibidor de angiogênese pode ser, mas não estão limitados a, por exemplo, cilengitide (EMD 121974), anticorpo anti-VEGF LM609, BMS-275291, Dalteparin (Fragmin®), Suramin, 2-metoxiestradiol (2-ME), Talidomida, CC-5013 (Thalidomida Analog), Combretastatin A4 Fosfato, LY317615 (Proteína Quinase C Beta Inibidor), AE-941 (Neovastat®; GW786034), Anticorpo Anti-VEGF (Bevacizumab; Avastin®, ZD6474, Carboxiamidotriazole (CAI), Celecoxib (Celebrex®).

[0084] Os anticorpos da invenção podem ser incorporados em uma composição farmacêutica adequada para administração. Tais composições compreendem tipicamente as regiões variáveis de anticorpo e um veículo farmacêuticamente aceitável. Conforme aqui usado, a linguagem "veículo farmacêuticamente aceitável" é pretendida para incluir qualquer e todos solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterial e antifungal, agentes de retardamento isotônico e de absorção, e similares, compatíveis com administração farmacêutica. O uso de tais meio e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é bem-conhecido na técnica.

[0085] Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com sua rota pretendida de administração. Exem-

plos de rotas de administração incluem administração parenteral, por exemplo, administração intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (*por exemplo*, inalação), transdérmica (tópica), transmucosa, e retal. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicólico, glicerina, propileno glicol, ou outros solventes sintéticos; agentes antibacteriais, tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou bisulfito de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilendiaminatetraacético; tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos, e agentes para o ajuste de tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido hidrocloreto ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser encerrada em ampolas, seringas disponíveis, ou frascos de dose múltipla de vidro ou plástico.

[0086] Os medicamentos que contêm as regiões variáveis de anticorpo da invenção podem ter uma concentração de 0,01 a 100% (p/p), embora a quantidade varie de acordo com uma forma de dosagem dos medicamentos.

[0087] A administração é preferivelmente uma vez por duas semanas ou uma vez por mês, mas pode ser mais ou menos frequente dependendo do comportamento farmacocinético da proteína 17E6/425-101 em um dado indivíduo. A dosagem de DI-17E6 ou outros anticorpos conforme especificado neste pedido (por exemplo, cetuximab) para um adulto de cerca de 70 quilogramas é na faixa de cerca de 50 a 1000 miligramas por dose, com uma faixa preferida de cerca de 100 a 500 miligramas por dose. A dose mais preferida é cerca de 400 miligramas para um adulto de 70 kg tratado uma vez por mês.

[0088] Os agentes quimioterapêuticos conforme aqui mencionado são administrados como uma regra em doses entre 10 mg/Kg e 100

mg/Kg.

[0089] Na terapia de combinação com um segundo agente terapêutico conforme especificado, o anticorpo projetado de acordo com a invenção pode ser dado simultaneamente com o segundo agente no ponto de partida da terapia ou após ou antes da administração do segundo agente.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:**

Figura 1A: sequências de cadeia leve variáveis de DI-17E6 (SEQ ID nº 1)

Figura 1B: sequências de cadeia pesada variáveis de DI-17E6 (SEQ ID nº 2)

Figura 1C: sequências de proteína de cadeia leve completas de DI-17E6: Regiões variáveis são sublinhadas, com CDR's em negrito.

Figura 1D: sequências de proteína de cadeia pesada completas de DI-17E6: Regiões variáveis são sublinhadas, com CDR's em negrito. Sequências em negrito em regiões constantes indicam região articulada de IgG1 modificado e modificações nas posições 296 e 297.

Figura 2: atividade antiangiogênica de DI-17E6 em um experimento de tampão Matrigel de macaco: detecção de antianticorpo em soro de macaco dependente da concentração do fármaco em dias diferentes (dose simples).

Figura 3: atividade antiangiogênica de DI-17E6 (EMD 525797) em um experimento de tampão Matrigel de macaco: detecção de antianticorpo em soro de macaco para dosagem de DI-17E6 (30 mg/Kg) dependente do tempo (longo prazo).

Figura 4: Efeitos de DI-17E6 no crescimento de tumor no modelo quimera de pele humana-SCID de camundongo com intradermal M21-L melanoma (administrado 3 vezes por semana a 1 mg/dose i.p. por 4 semanas, começando tratamento um dia após inoculação da

célula de tumor).

Figura 5: Efeitos de DI-17E6 no fator de crescimento induz angiogênese no modelo de tampão Matrigel em Fator de crescimento de macacos que induz inibição de angiogênese por EMD 525797 em macacos recebendo uma administração terapêutica simples i.v. (10 ou 30 mg/Kg). O tratamento foi no mesmo dia de implantação de Matrigel. Um animal contendo até 6 tampões de Matrigel foi usado por grupo. A análise de teor de hemoglobina (g de hemoglobina/mg de tampão Matrigel) foi realizada após 6 dias; os dados são médias  $\pm$  SE.

Figura 6: Efeito antiproliferativo de DI-17E6 combinado com Paclitaxel *in vitro* mostrado nas células HUVE.

Figura 7: Efeito sinérgico antiproliferativo de DI-17E6 combinado com cilengitida *in vitro* mostrado em linhagem de célula de melanoma humano M21. Curva superior: cilengitida sozinho, curva inferior: DI-17E6 + cilengitida.

Figura 8: Efeito antiproliferativo sinérgico de DI-17E6 combinado com cilengitida *in vitro* mostrado em linhagem de célula renal humana CAKI-2. Curva superior: cilengitida sozinho, curva inferior: DI-17E6 + cilengitida.

Figura 9: Efeito antiproliferativo sinérgico de DI-17E6 combinado cilengitida *in vitro* mostrado em linhagem de célula humana A498. A curva com triângulos DI-17E6 + cilengitida, curva com quadrados: cilengitida sozinho.

Figura 10: Efeito *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) no tratamento quimioterápico em um modelo de tumor de xenoinxerto de câncer pancreático ortotópico: Inibição de tumor pancreático NP18-b3 (10 mg de fragmentos de tumor ortotopicamente suturados no pâncreas de camundongos nus) por combinação de doses subótimas de EMD525797 e gemcitabina em doses diferentes. O tratamento começou 6 dias após cirurgia de fragmento de tumor. EMD 525797 foi ad-

ministrado três vezes por semana i.p. a 500 ug/dose. Gemcitabina foi administrada três vezes por semana i.p. a 50 ug/Kg. O peso do tumor é representado após 42 dias.

Figura 11: Efeito *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) em tratamento combinado com modelos de tumor de xenoenxertos de cisplatina (cPT) usando células de tumor M21 humanas transplantadas em camundongos usando doses subótimas de DI-17E6. O tratamento para EMD 525797 começou no mesmo dia do que a injeção de célula de tumor. O tratamento de cPT começou no dia 11 após injeção de célula de tumor. EMD 525797 foi administrado uma vez por semana i.p. a 500 ug/dose. cPT foi administrado uma vez por semana i.p. a 10mg/Kg.

Figura 12: Efeito *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) em tratamento combinado com modelos de tumor de xenoenxerto de darcabazina (DTIC) usando células de tumor MeWo humanas transplantadas em camundongos usando doses subótimas de DI-17E6. O tratamento para EMD 525797 começou no mesmo dia do que a injeção de célula de tumor. O tratamento de DTIC começou no dia 11 após injeção de célula de tumor. EMD 525797 foi administrado uma vez por semana i.p. a 500 ug/dose. DTIC foi administrado uma vez por semana i.p. a 50 mg/Kg.

Figura 13: : Efeito *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) sozinho em modelos de tumor de xenoenxertos usando células de tumor de carcinoma renal CAKI-1 humanas transplantadas em camundongos usando doses diferentes (ug/ml soro) de DI-17E6. eixo y: volume de tumor (mm<sup>3</sup>), eixo x: dias

Figura 14: Efeito *in vivo* de DI-17E6 (EMD 525797) em tratamento combinado com cetuximab (Erbix) em células de tumor de carcinoma renal de CAKI-1 transplantadas em camundongos usando DI-17E6 a uma concentração de soro constante de 100 ug/ml e Erbitux

a uma dose de 4 mg/Kg e 12 mg/Kg de peso corpóreo. O regime de dose é representado no Exemplo 13. eixo y: volume do tumor (mm<sup>3</sup>), eixo x: dias.

Figura 15: Mapa de plasmídeo de DI-17E6 plasmídeo de expressão pdHL10-DI-17E6Y2h(N297Q).

Figura 16: Estrutura esquemática de mAb DI-17E6 (EMD 525797).

Figura 17 A: Sequência de DNA complete de DI-17E6 a partir do códon de iniciação de translação para o códon de parada de translação da cadeia leve completa (capa humana) conforme usado no plasmídeo de expressão pdHL10-DI-17E6 (sequência de codificação no caso superior e sequência de não-codificação no caso inferior, sequência variável e constante em colorido cinza, sequência variável em itálicos) (SEQ ID nº 27)

Figura 17 B: Sequência de DNA de cadeia leve variável de DI-17E6 (SEQ ID nº 29)

Figura 17 C: Sequência de DNA de cadeia leve constante de DI-17E6 (SEQ ID nº 31)

Figura 18 A: Sequência de DNA complete de DI-17E6 a partir do códon de iniciação de translação para o códon de parada de translação da cadeia pesada completa conforme usado no plasmídeo de expressão pdHL10-DI-17E6 (sequência de codificação no caso superior e sequência de não-codificação no caso inferior, sequência variável e constante em colorido cinza, sequência variável em itálicos; articulação IgG1 modificada em negrito) (SEQ ID nº 33).

Figura 18 B: Sequência de DNA de cadeia pesada variável de DI-17E6 (SEQ ID nº 35)

Figura 18 C: Sequência de DNA de cadeia pesada constante de DI-17E6 (SEQ ID nº 37)

Figura 18 D: Sequência de DNA de articulação de IgG1

modificada da cadeia pesada de DI-17E6(SEQIDNo. 39)

Figura 19 A: Sequência de DNA de cadeia pesada completa de DI-17E6 (SEQ ID nº 41)

Figura 19 B: Sequência de DNA de cadeia leve completa de DI-17E6 (SEQ ID nº 43)

Figura 20A: Sequência de proteína de cadeia leve variável de anticorpo de camundongo 17E6. Sequências em negrito representam as CDRs. (SEQ ID nº 25).

Figura 20B: Sequência de proteína de cadeia pesada variável de anticorpo de camundongo 17E6. Sequências em negrito representam as CDRs. (SEQ ID nº 26).

Figura 21 A: ELISA de Ligação de Integrina de versões diferentes de anticorpos projetados. cruzamento (x) = 17E6VH/425VL-g2h(N-Q) cruzamento duplo (nº) = mAb 425 triângulo = DI 17E6 VH33/VL60.2-g2h(N-Q) diamante = 17E6-g2h(N-Q)

Figura 21B: ELISA de Ligação de Integrina de versões diferentes de anticorpos projetados. triângulo cheio: murino 17E6-g2h(N-Q) *triângulo:* DI-17E6VL60.2CDR-425VLFR4A/H33(C60Y)-g2h(FN->AQ) *quadrado* *cheio:* DI-17E6VL60.2CDR-425VLFR3FR4/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ) círculo cheio: DI-17E6-g2h(N-Q)(C60Y)

[0090] Os seguintes exemplos descrevem a invenção em detalhes adicionais. Contudo, embora usando parâmetros específicos, moléculas, etapas de método, etc, a invenção não é limitada a estes, se um técnico no assunto pode facilmente concluir a partir destes dados que a invenção pode ser efetuada com meios e métodos análogos.

### **Exemplo 1:**

*Construção e expressão dos anticorpos projetados de acordo com a invenção:*

[0091] De modo a reduzir imunogenicidade no homem, DI-17E6

(EMD 525797) foi produzido por desimunização e engenharia genética de murino 17E6.

[0092] O anticorpo fonte foi anticorpo monoclonal de camundongo 17E6 conforme descrito anteriormente. Este anticorpo foi gerado de camundongos imunizados com  $\alpha\beta 3$  humano purificado. Linfócitos de baço de camundongos imunizados foram fundidos com células de mieloma de murino e um dos clones de hibridoma resultantes produziu anticorpo monoclonal 17E6 (ver, por exemplo, EP0719859). A linhagem de célula de hibridoma que produziu referido anticorpo foi depositada sob DSM ACC2160.

[0093] Em princípio as regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de murino 17E6 foram analisadas em silico com a assim denominada metodologia de desimunização (WO 98/52976, WO 00/34317 e WO 02/069232) para remover epítomos de célula T potenciais. Sequências di-imunizadas VH e VL foram designadas para reterem aqueles aminoácidos a partir da sequência de murino críticas para ligação, tais como as CDRs.

[0094] O uso desta tecnologia sozinha conduz a um anticorpo, que mostra imunogenicidade reduzida ou eliminada em um indivíduo humano, mas não mostra ligação de afinidade suficiente e satisfaz taxas de expressão de um sistema de expressão de mamífero. Desse modo, o anticorpo tem que ser redesenhado por modificação da sequência de aminoácido em várias posições para reinstalar ligação de afinidade e expressão. Contudo, torna-se óbvio que enquanto aperfeiçoa o modelo de expressão, a ligação de afinidade diminui, e vice versa. Desse modo, muitas das versões de anticorpo têm que ser construídas, que foram investigadas para expressão e ligação de afinidade. A nova versão frequentemente mostra resultados surpreendentes, que não foram esperados quando o desenho da molécula foi planejado. Sequências de combinação de versão de anticorpo mostrando uma boa expressão

com sequências de versões de anticorpo mostrando boa ligação de afinidade frequentemente resulta em novas versões de anticorpo tendo má ligação de afinidade e expressão. Portanto, conforme já apontado, um prognóstico que mutações de anticorpo específicas induzem boa expressão e ligação de afinidade não foi possível.

Regiões variáveis de 17E6 di-imunizado (DI-17E6):

[0095] As regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH) do anticorpo monoclonal de camundongo 17E6 (SEQ. ID n°s 25 e 26) foram desimunizadas in silico pela tecnologia de desimunização conforme especificado acima, que removeu epítopos de célula auxiliadora T potenciais. Isto resultou em uma versão di-imunizada da VL denominada VL60.2 e uma versão di-imunizada da VH denominada VH33.

[0096] Anticorpo di-imunizado 17E6 consistindo do VL60.2 e VH33 produzidos por transfecção de células de mamífero retém ligação de afinidade ao  $\alpha\beta 3$  integrina, mas foi expresso pobremente.

[0097] Para otimizar expressão, as regiões de estrutura da cadeia leve foram substituídas por aqueles de um anticorpo humanizado 425 (Kettleborough *et al.*, Protein Engineering 4:773, 1991).

[0098] Além disso, a cisteína-60 não-emparelhada no VH33, que era rara entre sequências de VH, foi convertida em tirosina (C60Y) para proporcionar estabilidade de proteína.

[0099] O DNA que codifica o VL di-imunizado final (DI-17E6 VL, Figura 1A) e VH (DI-17E6VH, Figura 1A) foram quimicamente sintetizados, usando-se códons otimizados para expressão de mamífero.

Origem e fonte da linhagem de célula NSO-LD:

[00100] O mieloma de camundongo NSO foi obtido a partir da European Collection of Cell Cultures (ECACC n°85110503). A linhagem de célula NSO-LD foi obtida por seleção de células NSO para crescimento em meio livre de lipídeo e livre de soro, que consiste de meio de SM1F6 (Invitrogen) suplementado com 1 mM de piruvato de sódio (In-

vitrogen), 1 g/L de glicose (Merck KGaA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen), 0,1 de jaM Tropolone (Sigma), 10 (xM etanolamina (Sigma), e 2 mM de glutamina (Invitrogen). Estoques congelados de NS0-LD foram preparados em um meio de congelamento consistindo em 10% (v/v) de DMSO filtrado (Merck KGaA), 10% (v/v) de 1% de suspensão de metilcelulose em água (Sigma), 40% de meio de crescimento fresco e 40% de meio condicionado das células NS0-LD.

Construção do vetor de expressão para DI-17E6y2h(N297Q)

[00101] Uma sequência de peptídeo de sinal genômica (438-bp) de um gene de cadeia leve de imunoglobulina de camundongo foi usada para a secreção de ambas as cadeias leve e pesada. A sequência de gene que codifica o -2 resíduo de aminoácido (o -1 aminoácido sendo o resíduo C-terminal do peptídeo de sinal) do peptídeo de sinal foi mutagenizado de um resíduo de serina a um resíduo de leucina (AGC a TTA) de modo que o DNA que codifica a extremidade do peptídeo de sinal é CTTAAGC, onde CTTAAG é um local criado *AflW* (Lo *et al.*, Protein Engineering 11:495, 1998). Em adição, a sequência de consenso de Kozak CCACCATGG foi introduzida para ligação de ribossomo ótima para iniciação de translação em ATG (Kozak, Cell 44:283, 1986). Isto foi alcançado por mutação do primeiro resíduo de aminoácido após o códon de iniciação de AAG a GAG para dar a sequência TCTAGACCACCATGGAG, onde a sequência de consenso de Kozak é sublinhada e TCTAGA é um *Xba* local. Portanto, o peptídeo de sinal contém uma substituição no primeiro resíduo de aminoácido após o códon de iniciação, e outra substituição no resíduo de aminoácido na -2 posição. Desde que o peptídeo de sinal é clivado pela peptidase de sinal dentro da célula, e não aparece na proteína secretada, estas mutações não afetam a composição de aminoácido do produto de anticorpo.

[00102] O DNA de VL di-imunizado foi sintetizado como um frag-

mento *Afl*-*Bam*HI, e o DNA de VH di-imunizado foi sintetizado como um fragmento *Afl*-*Hind*III. Para o VL, a ligação ao condutor genômico via o local *Afl*W resultou em um fragmento *Xba*I-*Bam*HI que codifica o peptídeo de sinal-VL. Similarmente, a ligação do DNA de VH ao condutor genômico via o local *Afl*W resultou em um fragmento *Xho*I-*Hind*III que codifica o peptídeo de sinal-VH, onde *Xho*I substituído *Xba*I pela ligação do articulador. Os fragmentos resultantes de *Xba*I-*Bam*HI e *Xho*I-*Hind*III foram então inseridos no vetor de expressão pdHL10 (Figura 15), que já contém elementos de transcrição regulatórios e sequências de região constante de imunoglobulina (ver abaixo).

*Construções de DNA que codificam as regiões constante humanas*

[00103] Para a cadeia leve, a região constante capa humana genômica foi usada. Para a cadeia pesada, as regiões constantes genômicas humanas gama-2 ( $\gamma$ 2) foram usadas, com as seguintes modificações:

[00104] Primeiro, desde que as regiões de articulação  $\gamma$ 2 de imunoglobulina contêm quatro ligações de dissulfeto de cisteína, que conduzem a mistura de dissulfeto aumentada e agregação de proteína durante purificação, ela foi substituída por engenharia genética usando-se uma região de articulação  $\gamma$ 1 modificada conforme segue. A construção do Fcy2h DNA que codifica a articulação  $\gamma$ 1 modificada seguido pelas regiões de CH2 e CH3 de  $\gamma$ 2 já foram descritas (Lo *et al.* Protein Engineering, Design & Selection, 18:1,2005).

[00105] De modo a substituir a região de articulação  $\gamma$ 2 exon no gene Igy2 humano com a região de articulação  $\gamma$ 1 modificada exon, nós usamos reação de cadeia de polimerase (PCR) para reintroduzir o local de restrição *Pst*I imediatamente à montante do exon de articulação usando o Fcy2h DNA como gabarito.

[00106] O iniciador de avanço tem a sequência 5'-ctgcagAGCCCAAATCTTC, onde ctgcag é o local *Pst*I originalmente

presente na extremidade do (caso inferior), com ag sendo o local aceitador de união, e AGCCCAAATCTTC é a extremidade 5' da região de articulação y1 modificada exon (caso superior). O primer reversa tem a sequência 5'-cagctggggcctgtcctg, que hibridiza a uma sequência no íntron entre a região de articulação e CH2 exons. O 130-bp *Pst*I-*Pvu*II produto de PCR resultante contendo uma região de articulação y1 modificada exon, após clonagem de uma verificação de sequência, foi usado para substituir o fragmento correspondente no gene Igy2 no vetor de expressão pdHL10 (ver abaixo).

[00107] Segundo, uma mutação de Asn-297 no domínio de CH2 para Gin (N297Q) foi introduzida por sobreposição do PCR para remover o sinal de N-glicosilação, que anula as funções efetadoras e prolonga a meia vida do soro do anticorpo. Em adição, Phe-296 foi mutacionado para Ala, que remove qualquer epítomos de célula auxiliadora T criados pela mutação N297Q. Terceiro, existe um *Sma*I local de restrição localizado cerca de 280 bp à montante do códon de parada de translação na sequências de DNA tipo selvagem que codifica o domínio de CH3. Esta *Sma*I local foi destruído pela introdução de uma mutação muda (TCC a TCA). Outra mutação muda foi introduzida para criar um novo local *Sma*I único 4 bp à montante do códon de parada (Lo *et al.* Protein Engineering 11:495, 1998) para facilitar manipulação genética.

#### Construção de plasmídeo pdHL10 (Figura 15)

[00108] O vetor de expressão pdHL10 é derivado de pdHL7, que tinha sido descrito anteriormente (Gillies *et al.* J. Immunol. 160:6195, 1998). Como em pdHL7, as duas unidades transcricionais para as cadeias L e H em pdHL10 contêm p intensificador-promotor de CMV (Boshart *et al.*, Cell 41:521-530, 1985). O DNA para o intensificador-promotor de CMV foi obtido de um fragmento *A*fIII-*H*indIII do pcDNA1 comercialmente disponível (Invitrogen Corp., San Diego, CA).

[00109] A maior diferença entre pdHL7 e pdHL10 está na unidade de transcrição para o marcador de seleção de di-hidrofolato reductase (DHFR). O intensificador SV40 para esta unidade de transcrição foi destruído em pdHLiO conforme segue. Existem duas repetições 72-bp no intensificador-promotor SV40, e dentro de cada 72 bp está um local de restrição SphI. A ligação do local Sail 5' do intensificador ao local distal SphI através de um articulador-adaptador de oligonucleotídeo resultou na anulação de 120 bp a partir das duas 72-bp repetições. Tal promotor sem intensificador deve dar um nível de expressão muito inferior do marcador de seleção DHFR. Isto, na teoria, deve resultar em clones de célula pouco estavelmente transfectados, que, de modo a sobreviver à seleção de fármaco, podem ter o plasmídeo integrado em uma região de transcrição ativa de um cromossomo de modo que DHFR suficiente foi expresso a partir do promotor sem intensificador. Os genes de interesse, acionados por intensificadores e promotores totalmente funcionais devem ser expressos em níveis ainda mais altos nesta região de transcrição ativa. Em adição, a orientação desta unidade de transcrição atenuada foi revertida em pdHL10, de modo que o intensificador de CMV para a cadeia L não pode exercer um efeito direto no promotor distal SV40.

[00110] A construção pdHL10-DI-17E6y2h(N297Q) foi extensivamente mapeada por digestões de endonuclease de restrição (Figura 15). AS regiões de codificação das cadeias totais L e H foram completamente sequenciadas. Suas características proeminentes são descritas na Tabela seguinte:

| Par de base (Bp)nº         | Descrição                        | Literatura                                | Fonte de Informação de Sequencia  |
|----------------------------|----------------------------------|---|---|
| 0002 (EcoRI) - 0665 (XbaI) | intensificador e promotor de CMV | Boshart M et al. (1985), Cell 41, 521-530 | Locus <i>HS5/IEE</i> , Acesso <i>K03104</i> ; Sequência confirmada em EMD Lexigen |
| 0665 (XbaI) -              | Condutor genômico                | Schaeble KF et al. (1999),                | Locus MMU231201,  |

|                               |   |  |  |
|-------------------------------|---|--|--|
| 1112                          | de uma cadeia L de imunoglobulina de camundongo   | Eur. J. Immunol. 29, 2082-2086                                   | Acesso AJ231201; sequência de codificação confirmada em EMD Lexigen, mas, 6 nt de variações em intron <sup>1</sup>                                       |
| 1113- 1434                    | 17E6 VL di- imunizado   | Provido na Figura 1A   | Sequência confirmada em EMD Lexigen  |
| 1435 (BamHI at 1442)-1784     | Intron entre VL e CL  | Kawasaki K (2001), Eur. J. Immunol. 31, 1017-1028                | NG_000834 in Genbank; Sequência confirmada at EMD Lexigen  |
| 1785-2107                     | Região de codificação CL e códon de parada de translação  | Kawasaki K (2001), Eur. J. Immunol. 31, 1017-1028                | NGJ000834 em Genbank; Sequência confirmada em EMD Lexigen  |
| 2108 -2971 (Sail)             | Região não-transladada 3' e sinal de poliadenilação do gene de cadeia capa de imunoglobulina humana | Kawasaki K (2001), Eur. J. Immunol. 31, 1017-1028                | NGJD00834 em Genbank; Sequência confirmada em EMD Lexigen  |
| 2971 (Sail) - 3638 (XhoI)     | intensificador e promotor de CMV  | Boshart Metal. (1985), Cell 41, 521-530                          | Locus <i>HS51EE</i> , Accession <i>K03104</i> ; Sequência confirmada at EMD Lexigen  |
| 3638 (XhoI) - 4091            | Condutor genômico de uma cadeia L de imunoglobulina de camundongo                                   | Schaeble KF <i>et al.</i> (1999), Eur. J. Immunol. 29, 2082-2086 | Locus <i>MMU231201</i> , Acesso AJ231201; sequência de codificação confirmada em EMD mas, 6 nt de variações em intron <sup>2</sup>                       |
| 4092 – 4446                   | 17-E6 VH di- imunizado  | Provido na figura 2  | Sequência confirmada em EMD Lexigen  |
| 4447 (HindIII at 4454) - 6264 | Regiões constantes D2 de imunoglobulina com Articulador QI modificado                               | Krawinkel U. <i>et al.</i> (1982), EMBO J. 1 (4), 403-407        | Local <i>HUMIGCDJ</i> , Acesso <i>J00230 V00554</i> ; Sequência de codificação confirmada em EMD Lexigen, mas 4 nt de variações em intron <sup>3-5</sup> |
| 6265 (XhoI at 6266)-6515      | Região 3' não-transladada e sinal   | Forsman ZH <i>et al.</i> (2004), J. Virol. 78, 9306-9316         | Acesso <i>AF316141</i> ; Sequência confirmada em   |

|  |  |  |             |
|--|--|--|-------------|
|  | de poliadenilação de região posterior SV40 |  | EMD Lexigen |
|--|--|--|-------------|

|                    |   |  |   |
|--------------------|---|--|---|
| 6516 -8809 (EcoRI) | Origem de replicação e gene P-lactamase de pBR322   | Sutcliffe JG (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3737-3741             | Acesso J01749; Sequência parcialmente confirmada (6516 a 7192) em EMD Lexigen |
| 8809(EcoRI) -9038  | Promotor de SV40  | Uyinskii PO <i>et al.</i> (1992) J. Virology 66,6353-6360.                   | M99359.1 GI:310698 no Banco de Gene; Sequência confirmada em EMD Lexigen      |
| 9039 – 9602        | DHFR cDNA   | Simonsen CC e Levinson AD (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80,2495-2499 | Sequência confirmada em EMD Lexigen   |
| 9603 – 9687        | Região 3' não-transladada de DHFR fundido a sinal de poliadenilação de região anterior SV40 via ligação de extremidade Bgl 11 a extremidade Bel I | Strausberg RL (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903          | Acesso BC005796; Sequência confirmada em EMD Lexigen                          |
| 9688 – 9924        | Sinal de poliadenilação de região anterior SV40   | Forsman ZH <i>et al.</i> (2004), J. Virol. 78, 9306-9316                     | Acesso AF316141; Sequência confirmada em EMD Lexigen                          |

1. Seis variações de nucleotídeo (nt) no íntron do condutor foram encontradas entre o vetor pdHLW-DI-17E6y2h(N297Q) e as sequências publicadas. O vetor pdHL10-DI-17E6(C60Y)y2h(N297Q) contém G em 801, T em 985, C em 993, T em 1006, T em 1045 e A em 1071. A sequência publicada contém C, A, A, G, AC (um nt adicional), e G nestas respectivas posições.

2. Seis variações de nucleotídeo (nt) no íntron do condutor foram encontradas entre o vetor pdHLI 0-DI-17E6y2h(N297Q) e a sequência publicada. O vetor pdHL10-DI-17E6(C60Y) y2h(N297QJ) contém G em 3780, T em 3964, C em 3972, Tat 3985, T em 4024 e A em 4050. A sequência publicada contém C, A, A, G, AC (um nt adicional), e G nes-

*tas respectivas posições.*

3. *Duas variantes de nucleotídeo (nt) no íntron entre CH2 e CH3 foram encontradas entre o vetor pdHLW-DI-17E6y2h(N297Q) e a sequência publicada. O vetor pdHL10-DI-17E6(C60Y)γ2h(N297Q) contém A em 5908 e A em 5922. A sequência publicada contém G em ambas as respectivas posições.*

4. *Uma variante de nucleotídeo (nt) no CHI foi encontrada entre o vetor pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) e a sequência publicada. O vetor pdHL10-DI-17E6(C60Y)y2h(N297Q) contém G em 4736. A sequência publicada contém C nesta posição.*

#### Geração de Clones de Célula de Produção e Bancos de Célula de Pesquisa

##### *Transfecção e seleção de clones de alta produção*

[00111] O plasmídeo de expressão pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) linearizado por Fspl de endonuclease de restrição, cujo corte uma vez na sequência que codifica a β-lactamase, foi usado para transfectar células NSO-LD por eletroporação. Eletroporação foi realizada usando um Sistema de Gene PulserXcell®(BioRad, Hercules, CA) com ajustes a 250 volts e 15 ms de comprimento de pulso. Os clones estavelmente transfectados foram selecionados por crescimento em meio Super CD suplementado para conter nM metotrexato de 200 (Sigma, Cat. nº M-8407). O meio Super CD contém 9,69 g/L de meio AGT CD Hybridoma (Invitrogen, P/N RM-00-136), 2,52 g/L de bicarbonato de sódio (EMD, P/N SX0320-3), 30ml/L de CD Concentrado de Ácido Solúvel (Invitrogen, P/N 00-0336DK), 1,46 g/L de L-glutamina (Sigma, P/N G8540), 3 g/L de glicose (Sigma, P/N G-5400), 2 g/L de BD Select Soytone (Becton Dickenson, P/N 212488), e 2 g/L de BD Ultrafiltered Select Phytone (Becton Dickenson, P/N 210931). Os sobrenadantes de cerca de 474 clones estáveis de doze placas de 96 poços foram ensaiados por anti-humano Fc ELISA para identificar produtores altos.

Os níveis de expressão dos clones selecionados foram adicionalmente confirmados por cromatografia de afinidade de Proteína A recombinante (rPA). Clone nº395, que produziu 607 µg/ml de DI-17E6γ2h(N297Q) (por rPA) em cultura estacionária terminal em um frasco T de 25 cm<sup>2</sup>, foi escolhido para subclonagem por diluições limitantes.

[00112] Tentativas para subclonar em meio Super CD não foram bem-sucedidas. Portanto, clone nº395 foi adaptado para crescimento em meio MEM/F12 (Invitrogen, cat. nº 21041-025) suplementado para conter Tropolone a 5 µM (Sigma, cat. nº T7387), 10 uL/L de etanolamina (Sigma, cat. nº E0135), 10 ug/mL de insulina (bovina, liofilizada, Invitrogen, Cat. nº 13007-018), 2 g/L de Hypep 4601 (Quest International, cat. nº 5Z10419) e 2 g/L de Hypep 1510 (Quest International, cat. nº 5X59053), L-glutamina a 3,5 mM (Invitrogen, Cat. nº 25030-081), e metotrexato a 200 nM (Sigma, Cat. nº M-407) para uma passagem e subclonado em uma mistura 1:1 do meio completo DMEM/F12 com de metotrexato e meio a 200 nM condicionado completo DMEM/F12 (condicionado de uma cultura das células NS0-LD hospedeiras transfectadas, centrifugadas e então filtradas). Para subclonagem, as células foram colocadas 1, 5, 10 células/poço em placas de 96 poços. Em cerca de duas semanas, os subclones apareceram nas placas contendo 10 e 5 células/poço. Os subclones nos poços foram inspecionados sob o microscópio para assegurar que existe somente um clone visível na cavidade. Os sobrenadantes de 16 subclones das duas placas de 96 poços (10 células/poço) e 1 subclone de duas placas de 96 poços (5 células/poço) foram ensaiados por anti-humano Fc ELISA e os clones de alta produção foram escolhidos para análise de rPA. Os melhores subclones foram nº395-2 e nº395-6, produzindo 669 ug/ml e 735 ug/ml de DI-17E6γ2h(N297Q) (por rPA) em cultura estacionária terminal em frascos T de 75 cm<sup>2</sup>.

*Expressão do anticorpo*

[00113] Plasmídeos de expressão de mamífero foram construídos, transfectados em células NS/0, e transfectantes estáveis foram isolados. Tipicamente, células NS/0 foram estavelmente transfectadas com um vetor de expressão e introduzidas em uma cultura de 75 mililitros em um frasco T e crescidas por três dias, tal que a densidade de célula foi cerca de 400.000 células por mililitro. Sob estas condições, a concentração de DI-17E6 secretado foi cerca de 50-100 microgramas/ml.

#### *Purificação de anticorpo*

[00114] O anticorpo pode ser purificado usando, em sequência, algumas ou todas das seguintes etapas: cromatografia de coluna de Resina Misturada Abx, cromatografia de Proteína A recombinante, e Q cromatografia de coluna de Sepharose, seguida por diafiltração de fluxo tangencial Pellicon 2 para troca de tampão em tampão de formulação. As etapas de inativação do vírus e de remoção são interdigitalizadas nestas etapas. As etapas de inativação do vírus e de remoção não são necessárias para purificação por si, mas são usadas para satisfazer considerações regulatórias.

[00115] Ensaio para determinar ligação de anticorpo DI17E6 a subunidade de receptor de alfa V integrina. A capacidade do anticorpo DI17E6 se ligar a alfa V integrina foi ensaiada usando-se um ELISA. Brevemente, várias quantidades de anticorpo foram adicionadas aos poços contendo alfa V integrina, os poços foram então lavados, e o anticorpo ligado foi ensaiado de acordo com procedimentos padrões.

#### **Exemplo 2:**

**Geração de uma diversidade de mutações de anticorpo para encontrar expressão ótima e modelos de ligação de afinidade.**

[00116] Sumário de dados no aumento de nível de expressão de DI-17E6 por Problema de reengenharia na expressão: Os níveis de expressão das versões di-imunizadas foram ainda mais baixos do que

aquele do quimérico:

|                                    | Transiente em PER.C6 | NS0 de ECACC        | NS0-LD     |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|------------|
| chl7E6-g2h, g4ha e g4h(N a Q)      | ~3-4 ug/ml           | ~15 ug/ml           | ND         |
| delmm17E6 VH33-VL60.2-g2h(FN a AQ) | 0,3 ug/ml            | ~1 mcg/ml (96-poço) | ~1,6 ug/ml |
| delmm17E6VH33-VL49-g2h(FN a AQ)    | 0,7 ug/ml            | ~3 ug/ml            | ~10 ug/ml  |

[00117] Para aumentar o nível de expressão de delmm17E6 VH33-VL49A/L60.2-g2h(FN para AQ), foi mudado:

- C60 para S e Y em CDR2 de VH.
- GEAA volta para DGTV em VL para restaurar uma rede de ligação-H, mas um epítipo de célula T fraca potencial.
- V20M reversão em VH

[00118] Os resultados dos dois conjuntos de transfecção transiente foram resumidos abaixo:

Delmm 17E6 mutante (C60S) nível de expressão vs outro 17E6 (transfecção transiente em PER.C6, 24 uq em placa de 10 cm):

|   | Dia 1     | Dia 4      |
|---|-----------|------------|
| Delmm 17E6[VL49/VH33(C60S)]-g2h(FN->AQ) nº15          | 15,7ng/ml | 956 ng/ml  |
| Delmm 17E6[VL49/VH33(C60S)]-g2h(FN->AQ) nº16          | 13,1ng/ml | 734 ng/ml  |
| Delmm 17E6[VL49/VH33]-g2h(FN->AQ) nº44 (controle DI)  | 12,4ng/ml | 631 ng/ml  |
| Delmm 17E6[VL60.2/VH33]-g2h(FN->AQ) nº1 (controle DI) | 8,3 ng/ml | 589 ng/ml  |
| 17E6-g4h(FN->AQ) nº1 (controle quimérico)             | 174ng/ml  | 2716 ng/ml |
| 17E6-g2h nº6 (controle quimérico)                     | 149 ng/ml | 3582 ng/ml |

Delmm 17E6 nível de expressão de mutantes (transfecção transiente em PER.C6, 24 µq em placa de 10 cm):

|   | Dia 1     | Dia 4      |
|---|-----------|------------|
| Delmm 17E6[VL49(GEAA->DGTV)/VH33]-g2h(FN->AQ) nº1     | 192 ng/ml | 1187 ng/ml |
| Delmm 17E6[VL60.2(GEAA->DGTV)/VH33]-g2h(FN->AQ) nº20  | 120 ng/ml | 949 ng/ml  |
| 17E6-g2h nº66 (controle quimérico)                    | 271 ng/ml | 1442 ng/ml |
| Delmm 17E6[VL60.2/VH33]-g2h(FN->AQ).nº1 (Controle DI) | 65 ng/ml  | 883 ng/ml  |

Transfecções com miniprep DNA:

Delmm 17E6[VL49/VH33(V20M)]-g2h(FN->AQ) 5 ng/ml 0,77 ng/ml  
 n°5(mini,40ul)  
 Delmm 17E6[VL49/VH33(C60Y)]-g2h(FN->AQ) n°10(mini, 119 ng/ml 745 ng/ml  
 40ul)

[00119] 60S tem somente aperfeiçoamento marginal, pelo que no resultado de C60Y, o resultado é promissor. Se o resultado de C60Y se mantém maxiprep DNA, as transfecções das quais foram feitas, é necessário que assegurar que não existe perda na ligação de afinidade. A reversão de GEAA em DGTV aperfeiçoou a expressão por ao redor de 0,5 vezes a 2 vezes. O V20M resultante com miniprep DNA não é seguro, mas transfecção foi repetida com maxiprep DNA.

[00120] O aperfeiçoamento da expressão de delmm17E6: As seguintes novas construções foram usadas para transfectar células NSO:  
 pdHL 10-DI-17E6[VH3 3(C60 Y)/VL49(DGTV)]- g2h(FN-> AQ)  
 pdHL10-DI-17E6[VH33(C60Y)/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)  
 pdHL10-DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ)  
 pdHL10-DI-17E6[VH33(C60S)/VL60.2 (DGTV)]-g2h(FN->AQ)  
 pdHL10-17E6-g2h(FN-AQ) (Isto foi produzido para comparar nível de expressão com 17E6g2h.)

[00121] Teste para expressão transiente PER.C6 por HuFc-ELISA:

|   | Dia 2 | Dia 7      |
|---|-------|------------|
| 7E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)         | 304   | 2518 ng    |
| DI-17E6[VH33(C60Y)/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)   | 233   | 1674 ng/ml |
| DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)     | 433   | 2734 ng/ml |
| DI-17E6[VH33(C60S)/VL60.2 (DGTV)]- g2h(FN->AQ)  | 467   | 3138 ng/ml |
| 17E6-g2h(FN-AQ) (controle quimérico)            | 587   | 5425 ng/ml |
| 17E6-g2h (controle quimérico)                   | 537   | 3683 ng/ml |
| DI-17E6[VH33/VL60.2]- g2h(FN->AQ) (controle DI) | 48    | 669 ng/ml  |
| DI-17E6[VH33/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)         | 142   | 1302 ng/ml |
| DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49]- g2h(FN->AQ)           | 371   | 1535 ng/ml |

[00122] Os dados de ELISA mostraram que níveis de expressão de 17E6-g2h(FN-AQ) e 17E6-g2h foram comparáveis. Surpreendentemente os níveis de expressão de combinações de (C60S)/(DGTV) fo-

ram mais altos do que aqueles de (C60Y)/(DGTV), pelo que os resultados anteriores mostraram que C60Y e DGTV separadamente aumentam o nível de expressão de Delmm17E6 de 1x a 2-3x, pelo que C60S tem benefício mínimo.

[00123] 17E6VH/425VL-g2h(FN a AQ) e as seguintes transfecções transientes foram feitas:

|  | <u>Fc ELISA</u>        |
|--|------------------------|
| 17E6VH/425VL-g2h(FN a AQ) em triplicatas:                      | 28,5, 26,7, 18,7 ug/ml |
| DI-17E6[VH33(C60Y)AO]/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ)<br>em duplicatas | 2,1, 1,7               |
| DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ)<br>em duplicatas    | 2,7,1,7                |
| 17E6-g2h(FN->AQ) em duplicatas ( <b>controle químérico</b> )   | 4,9,4,0                |
| 425EU Ab em duplicatas ( <b>controle 425</b> )                 | 27,4, 20,0             |

[00124] Claramente, a mudança do VL aumenta o nível de expressão para aquele do 425 Ab!

[00125] Infelizmente, 17E6VH/425VL-g2h(FN to AQ) não liga av $\beta$ 3 na ligação ELISA (ver Figura 21).

[00126] De modo a solucionar o problema de expressão/ligação, as seguintes moléculas foram construídas:

[00127] Substituições de T8P e A44P em delmm17E6 VL:

DI-17E6 VL60.2(DGTV)com **T8P**/DI-17E6 VH33(C60Y) -g2h(FN a AQ)

DI-17E6 VL60.2(DGTV)com **A44P**/DI-17E6 VH33(C60Y) -g2h(FN a AQ)

DI-17E6 VL60.2(DGTV)com **T8P**/DI-17E6 VH33(C60S) -g2h(FN a AQ)

D1-17E6 VL60.2(DGTV)com **A44P**/DI-17E6 VH33(C60S) -g2h(FN a AQ)

[00128] As células foram transfectadas, embora as construções finais estão sendo confirmadas por sequenciamento (desde que digestão de restrição não possam distinguir recombinante de parental). A combinação de T8P e A44P pode ser necessária. Enxerta-se o 17E6 delmmVL CDRs no delmm425 VL FRs. Os níveis de expressão de delmm425VL/delmm17E6 VH foram testados, porque delmm425 VL não pode ser expresso ao mesmo alto nível como hu425 VL. O DI-

425VL1 foi usado, mas com uma reversão de P a L (VL1 não ligado). Consequentemente, a reversão de P a L em CDR3 foi feita para restaurar a ligação. Ela foi emparelhada com delmm17E6 VH33 (construção a abaixo) e ch17E6 VH(construção b abaixo). As transfecções transientes foram feitas usando-se os controles Hu425VL/ch17E6 VH (construção c abaixo), e ch17E6.

| <u>Constructos</u>                               | Expressão transiente por Fc <u>ELISA</u> |
|--|--|
| a.) DI-425VL1(P a L)/delmm17E6 VH33-g2h(FN a AQ) | 25                                       |
| b.) DI-425VL1(P a L)/chl7E6 VH-g2h(FN a AQ)      | 69                                       |
| c.) Hu425VL/chl7E6 VH-g2h(FN a AQ)               | 8394                                     |
| d.)17E6-g2h(FN a AQ)                             | 643                                      |

[00129] Os resultados transientes mostram que enquanto (c) dá nível de expressão muito alto, as construções a e b com DI-425VL dão nível ainda mais baixo do que aquele do ch17E6.

Clones de produção NSO-LD com  
pdHL10-425VLFrs/D117E6VL60.2CDRs/17E6VH33(C60S)-g2h(FN->AQ)-Ab e  
pdHL10-425VLFrs/DI-17E6VL60.2CDRs/17E6VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)-Ab.

[00130] Enxertos com (FR1+FR2 somente) não são expressos bem e se ligam pobremente, pelo que enxertos com (FR3+FR4) somente são expressos muito bem e se ligam bem. FR4 somente não opera. A tabela abaixo mostra que FR3 somente não aumenta expressão.

#### Transfecção transiente em PER.C6

##### Nome da Proteína

|   | huFc-<br>ELISA<br>(ug/ml) | huFc- ELI-<br>SA (ug/ml) | huFc-<br>ELISA<br>(ug/ml) | huFc-<br>ELISA<br>(ug/ml) | huFc-<br>ELISA<br>(ug/ml) |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| DI-17E6VL60.2CDR-<br>425VLF3/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ) | 0,79                      | 2,72                     |                           |                           |                           |
| DI-17E6VL60.2CDR-                                   | 14,17                     | 25,36                    | 19,6                      |                           | 17                        |

|  |       |       |      |     |      |
|--|-------|-------|------|-----|------|
| 425VLFR3FR4A/VH33(C60Y)-<br>g2h(FN->AQ)                      |       |       |      |     |      |
| DI-17E6VL60.2CDR-<br>425VLFRs/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)         | 20,78 | 31,76 | 24,3 |     | 28,5 |
| DI-17E6VL60.2CDR-<br>425VLFR1FR2A/VH33(C60Y)-<br>g2h(FN->AQ) |       |       | 4,5  |     | 6,2  |
| DI-17E6VL60.2CDR-<br>425VLFR4A/VH33(C60Y)-g2h(FN-><br>>AQ)   |       |       |      | 1,9 |      |
| DI-17E6VL60.2CDR-<br>425VLFR1/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)         |       |       |      | 3   |      |
| DI-17E6VL60.2CDR-<br>425VLFRs/77E6I/W-g2h(FN->AQ)            | 21,65 | 33,7  | 35,1 | 19  | 25,9 |
| 425VU17E6VH-g2h(FN->AQ)                                      | 35,14 | 53,66 | 47,3 | 40  | 51,9 |
| 17E6-g2h(FN->AQ)   | 3,74  | 8,86  | 9,8  | 4   | 8,7  |

#### Clones estáveis em NSO-LD em DMEM/F12 em frascos T25

| Nome da Proteína/clone nº                               | rPA<br>(ug/ml) |
|---|----------------|
| DI-17E6VL60.2CDR-425VLFRs/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)        |                |
| nº423   | 38             |
| nº433   | 135            |
| nº434   | 62,5           |
| nº10  | 381            |
| DI-17E6VL60.2CDR-425VLFR3FR4/VH33(C60Y)g2h(FN-><br>>AQ) |                |
| nº1   | 29,5           |
| nº2   | 31,3           |

[00131] DI-17E6-g2h(N a Q)(C60Y) foi escolhido como a molécula final por causa do nível de expressão dos clones estáveis NSO-LD clones e porque ele retém ligação de afinidade.

**Exemplo 3**

[00132] Para caracterizar especificidade de integrina de DI-17E6, ELISA, ELISA celular e análise de citometria de fluxo foram usados, e estes foi permitido identificar a cadeia  $\alpha v$  de integrinas como o ligante específico para EMD 525797.

[00133] EMD 525797 reconhece av-integrinas purificados, mas, conforme esperado, não tem reatividade contra  $\alpha IIb\beta 3$  purificado. EMD 525797 também interage com linhagens de célula humanas com av-integrinas em sua superfície celular, independentemente da subunidade de cadeia- $\beta$  associada. Imuno-reatividades de EMD 525797 e LM609 são representadas nas seguintes tabelas:

imunoreatividade em integrinas purificados

|            | $\alpha v\beta 3$ | $\alpha v\beta 5$ | $\alpha IIb\beta 3$ |
|------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| EMD 525797 | +                 | +                 | -                   |
| LM609      | +                 | -                 | '                   |

[00134] Reatividade de LM609 (anticorpo monoclonal de murino anti- $\alpha\beta 3$ ) é mostrada para comparação. Imuno-reatividade nas linhagens de célula de tumor

|  | Célula Teste           | M21                                    | M21-L               | MeWo                                   | HT29                                   | Co-lo205                               | SKBR-3            | A498              | V+B2              | CV-1              |
|--|------------------------|--|---------------------|--|--|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | modelo de av-integrina | $\alpha v\beta 3$<br>$\alpha v\beta 5$ | Nenhum av-integrina | $\alpha v\beta 3$<br>$\alpha v\beta 5$ | $\alpha v\beta 6$<br>$\alpha v\beta 5$ | $\alpha v\beta 6$<br>$\alpha v\beta 5$ | $\alpha v\beta 5$ | $\alpha v\beta 3$ | $\alpha v\beta 1$ | $\alpha v\beta 3$ |
|  |                        | +                                      | -                   | +                                      | +                                      | +                                      | +                 | +                 | +                 | +                 |
|  |                        | +                                      | -                   | +                                      | -                                      | -                                      | -                 | +                 | -                 | nd                |

[00135] Reatividade de LM609 (anticorpo monoclonal de murino antiav $\beta 3$ ) é mostrado para comparação. Linhagens de células de tumor humano: M21, M21-L, e MeWo melanomas; HT29 e Colo205 carcinomas de cólon; SKBR-3 carcinoma de seio; A498 carcinoma renal; e V+B2 melanoma ocular. CV-1 é uma linhagem de célula de macaco verde.

[00136] EMD 525797 reconhece av-integrinas de humano e macaco

somente, e nenhuma outra espécie. A base molecular para este perfil não-usual foi inequivocamente estabelecido por mapeamento de epítipo, comparação de sequência, e cocristalografia de raios x. O epítipo reconhecido por DI-17E6 é confirmado como único para humano e macaco por imunoprecipitação e análise de western blotting realizada com várias espécies.

#### **Exemplo 4**

##### Imunogenecidade

[00137] Os dados mostram que DI-17E6 é muito menos imunogênico do que a versão 17E6 de murino original. Figura 2 mostra que níveis de soro 17E6 de murino dados a um animal experimental diminuem consideravelmente junto com o tempo de experimento.

[00138] Por outro lado, os níveis de soro de anticorpos de macaco com especificidade contra murino 17E6 aumentou junto com o tempo de experimento e inversamente se correlaciona com os níveis de soro 17E6 de murino de queda.

[00139] Esta correlação inversa sugere que murino 17E6 é altamente imunogênica em macacos e homens, e, portanto, macacos ou humanos desenvolvem um MAMA respectivamente resposta HAMA, que afeta adversamente as farmacocinéticas de murino 17E6.

[00140] Outro objetivo do estudo foi adicionalmente avaliar atividade antiangiogênica de DI-17E6 em um experimento de tampão Matrigel de macaco. Para comparação, murino 17E6 foi usada como composto de referência.

[00141] Quatro grupos diferentes contendo um animal simples cada foram usados: veículo, murino 17E6 a 30 mg/Kg, DI-17E6 a 30 mg/Kg, e DI-17E6 a 10 mg/Kg. Os macacos receberam uma injeção i.v. (no braço) de murino 17E6 ou DI-17E6 no começo do experimento que continuou por 6 dias. (Figura 2)

[00142] Os soros foram coletados em três pontos diferentes (das

pernas): imediatamente antes da injeção de anticorpo, imediatamente (1-2 minutos) após injeção do anticorpo, e no final do estudo antes do sacrifício do animal. Os níveis de ambos murino 17E6, e DI-17E6 foram analisados. Para detectar dada diluição de soro) foram encontrados nos dois pontos de tempo diferentes: imediatamente após administração de anticorpo e no final do estudo. Isto foi observado em ambos grupos tratados com DI-17E6: 10 e 30 mg/Kg.

[00143] Contudo, os níveis de soro de murino 17E6 foram somente detectáveis imediatamente após injeção de anticorpo. Eles foram quase nulos pelo final do estudo. O experimento revelou vasta neutralização de resposta de anticorpo de antimurino de macaco (MAMA) contra 17E6, que claramente aponta para a alta imunogenicidade de murino 17E6 em macacos e outros primatas tais como humanos. Esta resposta conduz a rápido e completo clareamento de 17E6 a partir do soro do macaco.

[00144] Portanto, isto sugere que murino 17E6 é clareada mais rapidamente em humanos, por uma vasta resposta de HAMA.

[00145] Em outro estudo os parâmetros farmacocinéticos de uma dose simples de DI-17E6 em macacos foram avaliados e em adição, este estudo foi planejado para investigar a imunogenicidade de DI-17E6. DI-17E6 foi dado a 1 mg/Kg como uma injeção simples i.v. no começo do experimento. A duração do ensaio foi 6 semanas. Os soros foram retirados em pré-dose, e 1, 3, e 6 semanas após administração. Os níveis de anticorpos de macaco contra DI-17E6 foram analisados. Neste estudo, a imunogenicidade foi diretamente determinada usando-se um método ELISA intercalado específico designado para este tipo de estudos (método não validado ainda).

Figura 3 mostra que nenhum anticorpo de macaco contra DI-17E6 pode ser detectado em qualquer ponto de tempo do ensaio, portanto, indicando claramente que resposta anti-humana (MAHA) de

macaco baixa foi gerada.

[00146] Em experimentos adicionais, imunogenicidade de ambos anticorpos foi determinada indiretamente, por estudo dos níveis de soro sustentados dos dois anticorpos variantes 17E6, murino 17E6 e DI-17E6. DI-17E6 tinha altos níveis de soro em cada ponto de tempo do ensaio, sugerindo que DI-17E6 não disparou resposta de anticorpo, e assim não imunogênica em macacos. Em contraste, murino 17E6 não pode ser detectada (níveis muito baixos a nulos) em soro pelo último ponto de tempo. Isto indica novamente que macacos montam uma resposta MAMA de clareamento contra murino 17E6 devido a sua imunogenicidade.

[00147] Devido a 17E6 ser di-imunizado baseado na eliminação de epítomos de reconhecimento de célula T humana, o DI-17E6 imunogênico é esperado ser baixo em humanas, permitindo dosagem terapêutica repetida sem a complicação de elevação de uma resposta imune que pode contra-agir com a eficiência terapêutica. Isto é uma descoberta única que devido ao alto grau de homologia entre macaco e genoma humano, incluindo o 17E6 antígeno alfa-v integrina, pode ser prontamente estendido a situação humana.

[00148] Isto foi por enquanto confirmado por um primeiro estudo clínico efetuado nos Estados Unidos em 2006/2007. DI-17E6 foi administrado a 5 grupos de voluntários saudáveis (cada grupo contém 6 voluntários) em doses diferentes: 200 mg/Kg; 120 mg/Kg; 70mg/Kg, 35 mg/Kg correspondendo a 250 mg, 500 mg, 1000 mg e 1500 mg/dose. Somente no grupo de 250 mg um voluntário desenvolveu anticorpos d anti-fármaco, pelo que nos grupos de dose mais alta (estas doses estão na faixa de uma administração terapêutica padrão) nenhum voluntário desenvolveu qualquer resposta imune contra DI-17E6. Em contraste a isto, 17E6 de macaco desenvolve em modelos de animal uma forte resposta imune.

[00149] De acordo com o mapeamento de epítopo de célula T e método de eliminação aqui usado, no qual a sequência do anticorpo de camundongo é dividida em peptídeos de sobreposição, a perda de imunogenicidade após desimunização foi confirmada por uma diminuição distinta de classificação em um ensaio de célula T *in vitro* indicando que epítopos humanos potenciais de célula T tinham sido anulados. Conseqüentemente, a classificação diminui de 147 (camundongo 17E6) para 92 (DI-17E6) nas cadeias leves, e de 181 (camundongo 17E6) para 85 (DI-17E6) nas cadeias pesadas.

Cadeia leve 12E6 de macaco

| Posn | Sequência | nLig. | Classificação | Média |
|------|-----------|-------|---------------|-------|
| 15   | LGDRVIISC | 4     | 100,16        | 25,04 |
| 19   | VIISCRASQ | 31    | 1177,12       | 37,97 |
| 20   | IISCRASQD | 1     | 22,34         | 22,34 |
| 21   | ISCRASQDI | 3     | 78,13         | 26,04 |
| 29   | ISNYLSWYQ | 7     | 169,20        | 24,17 |
| 33   | LSWYQQKPD | 1     | 20,93         | 20,93 |
| 44   | VKLLIFYTS | 12    | 303,43        | 25,29 |
| 46   | LLIFYTSKL | 24    | 940,44        | 39,18 |
| 47   | LIFYTSKLH | 15    | 497,37        | 33,16 |
| 48   | IFYTSKLHS | 34    | 1151,58       | 33,87 |
| 50   | YTSKLHSGV | 1     | 25,29         | 25,29 |
| 54   | LHSGVPSRF | 2     | 52,00         | 26,00 |
| 71   | YSLTISNLD | 3     | 76,60         | 25,53 |
| 83   | IATYFCQQG | 2     | 40,82         | 20,41 |
| 86   | YFCQQGNTF | 4     | 84,56         | 21,14 |

|    |           |   |       |       |
|----|-----------|---|-------|-------|
| 98 | FGGGTKVEM | 3 | 94,75 | 31,58 |
|----|-----------|---|-------|-------|

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| <b>Classif. Total</b> | <b>147</b> |
|-----------------------|------------|

---

Cadeia leve final Del 17E6

| Posn                       | Sequência  | nLig      | Classificação | Média |
|----------------------------|------------|-----------|---------------|-------|
| 2                          | *IQMTQSPSS | 22        | 615,49        | 27,98 |
| 15                         | *VGDRVITIC | 5         | 139,09        | 27,82 |
| 19                         | *VTITCRASQ | 17        | 421,29        | 24,78 |
| 21                         | ITCRASQDI  | 3         | 86,42         | 28,81 |
| 29                         | *ISNYLAWYQ | 4         | 98,65         | 24,66 |
| 46                         | LLIYYTSKI  | 33        | 1195,64       | 36,23 |
| 47                         | LIYYTSKIH  | 15        | 497,37        | 33,16 |
| 48                         | IYYTSKIHS  | 30        | 906,02        | 30,20 |
| 49                         | YYTSKIHS   | 1         | 20,00         | 20,00 |
| 50                         | YTSKIHS    | 1         | 25,29         | 25,29 |
| 54                         | IHS        | 2         | 52,00         | 26,00 |
| 71                         | YTFTISSLQ  | 4         | 115,43        | 28,86 |
| 73                         | *FTISSLQPE | 3         | 71,05         | 23,68 |
| 83                         | IATYYCQQG  | 2         | 40,82         | 20,41 |
| 86                         | YYCQQGNTF  | 4         | 88,56         | 22,14 |
| 94                         | *FPYTFGQGT | 2         | 44,83         | 22,41 |
| 98                         | *FGQGTKVEI | 5         | 135,81        | 27,16 |
| <b>Class. Total score:</b> |            | <b>92</b> |               |       |

---

Cadeia pesada de macaco 17E6 cadeia pesada de macaco

| Posn                        | Sequência | nLig.      | Classificação | Média |
|-----------------------------|-----------|------------|---------------|-------|
| 2                           | VQLQQSGAE | 5          | 129,45        | 25,89 |
| 4                           | LQQSGAELA | 6          | 140,28        | 23,38 |
| 18                          | VKMSCKASG | 27         | 881,03        | 32,63 |
| 27                          | YTFSSFWMH | 2          | 46,55         | 23,28 |
| 29                          | FSSFWMHWW | 3          | 80,61         | 26,87 |
| 32                          | FWMHWWKQR | 18         | 546,68        | 30,37 |
| 33                          | WMHWVKQRP | 2          | 59,09         | 29,55 |
| 36                          | WVKQRPQG  | 9          | 229,70        | 25,52 |
| 37                          | VKQRPQGL  | 4          | 90,82         | 22,70 |
| 47                          | WIGYINPRS | 9          | 282,09        | 31,34 |
| 48                          | IGYINPRSG | 10         | 280,39        | 28,04 |
| 51                          | INPRSGYTE | 3          | 81,56         | 27,19 |
| 63                          | IFRDKATMT | 7          | 197,95        | 28,28 |
| 64                          | FRDKATMTA | 19         | 609,26        | 32,07 |
| 80                          | YMQLSGLTS | 22         | 678,41        | 30,84 |
| 81                          | MQLSGLTSE | 5          | 116,59        | 23,32 |
| 83                          | LSGLTSEDS | 3          | 63,39         | 21,13 |
| 93                          | VYYCASFLG | 11         | 297,27        | 27,02 |
| 94                          | YYCASFLGR | 2          | 51,02         | 25,51 |
| 99                          | FLGRGAMDY | 11         | 321,71        | 29,25 |
| 107                         | YWGQGTSVT | 1          | 23,40         | 23,40 |
| 108                         | WGQGTSVTV | 2          | 62,07         | 31,03 |
| <b>Classificação total:</b> |           | <b>181</b> |               |       |

---

Cadeia pesada final Del 17E6

| Posn | Sequência  | nLig. | Classificação | Média |
|------|------------|-------|---------------|-------|
| 2    | VQLQQSGGE  | 5     | 129,45        | 25,89 |
| 18   | *VKVSCKASG | 12    | 366,95        | 30,58 |
| 27   | YTFSSFWMH  | 2     | 46,55         | 23,28 |
| 29   | FSSFWMHWW  | 3     | 80,61         | 26,87 |
| 32   | FWMHWVRQA  | 14    | 673,39        | 48,10 |
| 33   | *WMHWVRQAP | 2     | 52,27         | 26,14 |
| 36   | *WVRQAPGQG | 17    | 473,32        | 27,84 |
| 37   | *VRQAPGQGL | 8     | 276,30        | 34,54 |
| 47   | WIGYINPRS  | 9     | 282,09        | 31,34 |
| 48   | IGYINPRSG  | 10    | 280,39        | 28,04 |
| 51   | INPRSGYTE  | 3     | 81,56         | 27,19 |
| 63   | IFRDKATMT  | 7     | 197,95        | 28,28 |
| 64   | FRDKATMTT  | 10    | 304,58        | 30,46 |
| 80   | *YMELSSLRS | 16    | 481,10        | 30,07 |
| 81   | *MELSSLRSE | 1     | 35,56         | 35,56 |
| 86   | *LRSEDTAVY | 12    | 357,27        | 29,77 |
| 93   | VYYCASFLG  | 11    | 297,27        | 27,02 |
| 94   | YYCASFLGR  | 2     | 51,02         | 25,51 |
| 99   | FLGRGAMDY  | 11    | 321,71        | 29,25 |
| 107  | YWGQGTSVT  | 1     | 23,40         | 23,40 |
| 108  | WGQGTSVTV  | 2     | 62,07         | 31,03 |

**Classificação total: 85**

---

### **Exemplo 5**

[00150] Embora DI-17E6 não reaja por cruzamento com receptor de fibrinogênio de plaqueta  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , as plaquetas também expressam al-

guns av-integrinas. Para excluir possíveis efeitos colaterais do anticorpo em plaquetas, EMD 525797 foi avaliado para inibição de agregação de plaqueta *in vitro* com plasma/colágeno rico em plaqueta humana. Nenhuma atividade antiagregação foi detectada nem em 160 nM ou 1600 nM. Estudos de agregação e ativação foram efetuados usando-se Plasma Rico em Plaqueta (PRP). Formação de trombo por câmara de perfusão com matriz subendotelial exposta.

[00151] O resultado experimental pode ser resumido conforme segue:

[00152] DI-17E6 não induz qualquer ativação de plaqueta nem agregação de plaqueta em qualquer concentração (de muito baixa a muito alta: 0,1 a 1000 ug/ml).

[00153] Surpreendentemente, DI-17E6 bloqueia agregação de plaqueta induzida por um indutor de agregação fraco similar a ADP, em uma maneira dependente da dose. DI-17E6 não afeta agregação da plaqueta induzida por um forte indutor de agregação similar a colágeno. DI-17E6 afeta também (bloqueia) formação de trombo na plaqueta na câmara de perfusão, em uma maneira dependente da dose e revela uma atividade antitrombótica.

A interferência fraca com agregação de plaqueta é uma descoberta inesperada para DI-17E6 como potencial que pode tornar-se terapeuticamente útil como a vizinhança de um tumor é caracterizada por muitos locais vasculares trombogênicos.

### **Exemplo 6**

[00154] Atividade antiangiogênica *in vivo* em modelos de tumor de xenoenxerto de camundongo

[00155] Pele humana contendo células de melanoma M21 humanas foram enxertadas por implante/transplante em SCID ou camundongos sem pele. Tumores experimentais cresceram neste tecido após inoculação intradermal de células de tumor e a vasculatura angiogênica ini-

cial foi derivada de vasos na pele humana. No próximo experimento, o uso de células M21-L que não tinham nenhum av-integrina significa que somente aquelas integrinas expressos nas células endoteliais dentro da pele humana enxertada foram direcionados.

[00156] DI-17E6 inibiu crescimento de tumores M21-L no modelo de quimera de pele de camundongo-humano SCID e foi ativa a uma dose de 1 mg/dose administrada i.p. 3 vezes por semana começando tratamento um dia após inoculação de célula de tumor (Figura 4). Esta descoberta demonstrou que EMD 525797 induz um efeito antiangiogênico no crescimento do tumor.

### **Exemplo 7**

[00157] Inibição de fator de crescimento induziu angiogênese no modelo de tampão Matrigel em macacos por injeção i.v. de EMD 525797.

[00158] Para estender a avaliação da atividade antiangiogênica de EMD 525797, ele foi testado em modelo livre de tumor em macacos, onde angiogênese é induzida pelo fator angiogênico bFGF.

[00159] Tampões Matrigel contendo bFGF foram implantados s.c. no abdômen de macacos Cynomologus saudáveis. Os animais foram injetados uma vez com EMD 525797 i.v. em ou 10 mg/Kg ou 30 mg/Kg. A avaliação de angiogênese foi efetuada 6 dias após por quantificação do teor de hemoglobina nos tampões de Matrigel. O tratamento de macacos com EMD 525797 bloqueou nova formação de vaso sanguíneo em uma maneira dependente de dose, sendo altamente eficaz a 30 mg/Kg, mas inativo a 10 mg/Kg (Figura 5).

### **Exemplo 8**

*Teste in vitro de DI17E6 em combinação com agentes quimioterapêuticos em células HUVE*

[00160] No estudo atual, agentes quimioterapêuticos representativos de classes diferentes de inibidores, em combinação com o inibidor

de alfa-v integrina cilengitida e Di-17E6, foram investigados. O desenho experimental deu resposta a questões se bloqueio de um abaixou o IC50 do outro para bloqueio do crescimento de célula endotelial na presença de fatores de crescimentos de tumor VEGFA e FGF2. Os testes foram realizados com HUVEC e células endoteliais de microvaso, que foram suplementados por VEGFA e FGF2 que estimulam o crescimento de tais células por um fator de até 500%.

[00161] As placas foram revestidas com 100 µl de VN a 1 ug/ml em PBS por 96 poços a 4°C durante a noite. As células foram colocadas em 5x10e3 células/poço em 100 µl de Meio 199 contendo 2% de FCS. Após 60 minutos a 37°C, bloqueadores de alfa V integrina e agentes quimioterapêuticos foram adicionados sozinhos ou em combinação em concentração duas vezes em 100 µl/poço em Meio 199 mais 2% de FCS e 20 ng/ml de FGF-2, para as células HUVE, ou com 20 ng/ml de VEGF para as células HDMVEC (concentração final de fatores de crescimento foi 10 ng/ml). Quando adicionadas em combinação as duas substâncias testes foram misturadas nas concentrações de partida e a mistura foi diluída em série como para os agentes simples sozinhos. Em alguns ensaios os quimioterapêuticos foram diluídos em série na presença de uma quantidade constante dos bloqueadores alfa V nas concentrações de IC<sub>50</sub> ou IC<sub>70</sub>. As placas foram incubadas por 72 horas, em seguida número de célula relativo foi determinado pela adição de 20 µl/poço de Alamar Blue (Resazurin). Após 4 horas de incubação a 37°C, a fluorescência foi lida em uma leitora de placa Genios (SLT) a 535/590nm (excitação/emissão).

[00162] Os pontos foram operados em duplicata ou em triplicata. Vazios de reagentes contendo meio mais Alamar Blue sem células foram operados em cada placa. Os valores em branco foram subtraídos dos valores de teste e foram rotineiramente 5-10% dos valores de controle não-inibidos.

[00163] Cilengitida foi testada na faixa de 50  $\mu$ M a 0,1 nM. Anticorpos 17E6 e DI-17E6 foram testados a 50  $\mu$ g/ml a 0,1 ng/ml. AS concentrações de partida dos agentes quimioterapêuticos que foram testados são dadas na tabela abaixo:

| Agente quimioterapêutico | Mecanismo de Ação             | Concentração de partida |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Taxol                    | Taxane/microtúbulos           | 50 ng/ml                |
| Etoposídeo               | Inibidor Topoisomerase II     | 100 $\mu$ M             |
| Vincristina              | Vinca alcaloide/micro-túbulos | 10 nM                   |
| Cis-platinina            | Platina análoga               | 200 $\mu$ M             |
| Camptotecina             | Inibidor topoisomerase 1      | 10 $\mu$ M              |
| Doxorubicina             | Antraciclina                  | 1 $\mu$ M               |
| Melfalan                 | Agente de alquilatação        | 100 $\mu$ M             |
| Temazolomida             | Agente de alquilatação        | 50 $\mu$ M              |
| Estramustina             | Agente de alquilatação        | 100 $\mu$ M             |
| 5-FU                     | Antimetabólito                | 100 $\mu$ M             |
| Gemcitabina              | Antimetabólito                | 50 nM                   |

[00164] O alfa V integrina que bloqueia substância Cilengitida (EMD 121974) e dois anticorpos de bloqueio de função de alfa V integrina, 17E6 (EMD 73034) e sua forma di-imunizada DI-17E6 (EMD 525979), foram testados sozinhos e em combinação com agentes quimioterapêuticos comuns em um ensaio de crescimento de estimulação FGF usando células endoteliais humanas convencionais (HUVEC) ou em um ensaio de estimulação VEGF usando células endoteliais vasculares microdermais humanas. Neste sistema de ensaio, as células são cultivadas em um meio de soro reduzido (2% de FCS em Meio 199) com FGF-2 ou VEGF como o único estímulo de crescimento. Os fatores de crescimento FGF-2 voltaram a ser o melhor estimulante de crescimento para HUVEC e VEGF e foi o melhor estimulante para HDMVEC medido usando-se o ensaio Aiamar Blue. HUVEC recebem-

do 12,5 ng/ml de FGF-2 mostrou um aumento de 406% e com VEGF um aumento de 238% sobre as células de controle que não receberam adição de fatores de crescimento após 72 horas de crescimento em VN. Em contraste, os HDMVEC foram preferencialmente estimulados por VEGF do que FGF-2, (484%). Os testes foram rotineiramente operados usando-se HUVEC em meio contendo 10 ng/ml de FGF-2 ou HDMVEC em meio contendo 10 ng/ml de VEGF. Os bloqueadores alfa V integrina e Paclitaxel inibem o crescimento de célula quando adicionado como agentes simples. Em um teste típico usando-se HUVEC, o IC<sub>50</sub> para Cilengitida foi 700 nM, para 17E6 foi 5 ng/ml e para DI-17E6 4 ng/ml. Para Paclitaxel, o IC<sub>50</sub> foi 0,27 ng/ml quando adicionado sozinho, mas o IC<sub>50</sub> foi reduzido para 0,13 ng/ml quando usado em combinação com Cilengitida. Os anticorpos 17E6 e DI-17E6 causaram uma redução no IC<sub>50</sub> de Paclitaxel para 0,18 ng/ml e 0,1 mg/ml, respectivamente. Um resultado típico para DI17E6 quando usado em combinação com Paclitaxel é mostrado na Figura 6.

[00165] O efeito aditivo de Paclitaxel com bloqueadores alfa V integrina foi obtido com HDMVEC também. A lista completa dos agentes quimioterapêuticos testados é mostrada na Tabela seguinte.

| Quimioterapêutico | Cilengitida | Mab 17E6 | DI-17E6 | IC50      |
|-------------------|-------------|----------|---------|-----------|
| Taxol             | sim         | Sim      | sim     | 0,3 ng/ml |
| Etoposídeo        | sim         | Sim      | sim     | 0,7 uM    |
| 5FU               | sim         | Sim      | sim     | 14,5 uM   |
| Cisplatinina      | sim         | Sim      | sim     | 13,2 uM   |
| Melfalan          | sim         | Sim      | sim     | 11,4 uM   |
| Doxorubicina      | sim         | Sim      | sim     | 0,2 uM    |
| Camptotecina      | sim         | Sim      | sim     | 0,08 uM   |
| Vincristin        | sim         | Sim      | sim     | 0,7 nM    |
| Gemcitabina       | sim         | Sim      | sim     | 4 nM      |
| Estramustina      | Não         | Não      | Não     | 182 uM    |
| Temozolmide       | não         | Não      | não     | inativo   |
| <b>121974</b>     |             |          |         | 296 nM    |
| <b>Mab 17E6</b>   |             |          |         | 5 ng/ml   |

|         |  |  |  |         |
|---------|--|--|--|---------|
| DI-17E6 |  |  |  | 4 ng/ml |
|---------|--|--|--|---------|

[00166] Os resultados mostram que em HUVEC DI-17E6 causa um efeito aditivo distinto quando combinado com um segundo agente terapêutico similar a Paclitaxel, pelo que outros quimioterapêuticos mostram, quando combinados com um anticorpo projetado de acordo com a invenção, nenhum efeito ou somente um efeito aditivo leve.

### **Exemplo 9**

[00167] *Teste in vitro de DI17E6 em combinação com agentes quimioterapêuticos em células de melanoma humanas diferentes.*

[00168] Em um ensaio de proliferação *in vitro*, o efeito de uma diversidade de quimioterapêuticos bem-conhecidos e aplicados em terapia de tumor foi investigado quando combinado com DI-17E6 em linhagens de célula de melanoma humano diferente: m21, SKMEL-23, SKMEI; MeWo, WM-793.

[00169] Os resultados mostram que existem somente leves diferenças com relação aos agentes quimioterapêutico usados (neste caso: cisplatina, paclitaxel, vinblastina, vincristin e temoiolomida.

[00170] As diferenças são reconhecíveis com relação à linhagem de célula de tumor usada. Em todos os casos, DI-17E6 não causa mais do que efeitos aditivos dos agentes quimioterapêuticos.

[00171] Em resumo: nenhum efeito ou somente um efeito aditivo leve foi observado com a combinação DI-17E6 mais agente quimioterapêutico para tais linhas de tumor, que são insensíveis a DI-17E6. Um forte efeito aditivo pode ser detectado com a combinação DI-17E6 mais agente quimioterapêutico para tais linhagens de célula de tumor, que são sensíveis a DI-17E6. Nestes casos o perfil de proliferação corresponde àquele conforme representado para paclitaxel + DI-17E6 em HUVEC (ver Figura 6).

### **Exemplo 10**

*Combinação sinérgica de DI-17E6 e cilengitida in vitro*

[00172] Descobertas inesperadas foram alcançadas quando combinações de DI-17E6 e cilengtida foram testadas *in vitro*. As linhagens de célula de NSCLC H322, A549, H1975 e H460, linhagem de célula de melanoma humano M21, e linhagens de célula de carcinoma renal ACHN, A498, Caki 1 e Caki2 foram tratadas com cilengtida na presença de DI-17E6. Os resultados mostraram morte celular mais considerável após 3 dias crescidas em meio normal, do que na presença de cilengtida ou Di-17E6 sozinho.

[00173] Uma composição experimental típica para testar o efeito sinérgico de DI-17E6 e cilengtida foi realizada como ensaio de proliferação com células de M21, CAKI-2 e A498: placas de 96 poços foram revestidas com vitronectina, e após serem bloqueadas, as células foram adicionadas (3000-5000 células/poço) e após 4 horas (tempo bastante para permitir fixação e difusão da célula) fármacos são adicionados e permitidos crescerem na presença de Cilengtida diluída em série sozinha ou junto com DI-17E6 a 1 µg/ml. As células foram adicionalmente incubadas por 3 dias, e a viabilidade da célula foi medida seguindo as instruções do fornecedor do reagente Alamar Blue.

Figura 7 proporciona a taxa de morte celular para referida combinação em células de M21 (curva superior: cilengtida sozinho, curva inferior cilengtida + DI-17E6).

Figura 8 proporciona a taxa de morte celular para referida combinação em células de CAKI-2 (curva superior: cilengtida sozinho, curva inferior cilengtida + DI-17E6).

Figura 9 proporciona a taxa de morte celular para referida combinação em células de A498 (curva superior: cilengtida sozinho, curva inferior cilengtida + DI-17E6).

Esta é uma descoberta não-usual com ambos ligantes alfa v integrinas que consideram pré-saturação do sistema com um inibidor alostérico, antes de adições pulsadas dos inibidores competitivos na

presença continuada do inibidor alostérico. Isto dá um bloqueio sinérgico da integrina, amplificando grandemente o efeito do inibidor competitivo sozinho, ou inibidor estérico/alostérico sozinho. Importaneamente, a presença contínua dos inibidores competitivos não é usualmente necessário, seu papel é liberar a interação primária, permitindo o acesso do inibidor alostérico.

### **Exemplo 11**

*Teste in vivo de DI-17E6 em combinação com agentes quimioterapêuticos*

Gemcitabina mais DI-17E6 em células humanas pancreáticas NP18-b3 humana

[00174] O crescimento de um tumor pancreático ortotopicamente xenoenxertado em camundongos nus foi investigado sob cotratamento sistêmico EMD 525797 mais gemcitabina. Gemcitabina foi selecionada para o tratamento combinado de um modelo de tumor pancreático humano ortotopicamente xenoenxertado porque este é o agente quimioterapêutico mais aprovado para esta indicação.

[00175] Linhagem de célula humana pancreática NP18-b3, que expressa  $\alpha\beta3$ -integrina, foi implantada ortotopicamente no pâncreas de camundongos imunossuprimidos. Os animais foram randomizados e uma semana mais tarde tratamento com fármacos e veículo começou.

[00176] Os tumores foram removidos e cortados em peças de 10 mg cada. Estas peças foram então suturadas ao pâncreas de animais saudáveis (uma peça por animal). 4-6 semanas mais tarde, os tumores foram removidos, cortados em peças novamente e costurados em novos animais. Aqueles novos animais foram então randomizados e uma semana mais tarde tratamento com fármacos e veículo foi iniciado. EMD 525797 foi dosado i.p. a 500  $\mu\text{g}$  por animal três vezes uma semana. Gemcitabina foi administrada como uma dose subótima de 50 mg/Kg 3 vezes uma semana (dose subótima baseada em estudos pré-

vios). Em um quarto grupo, EMD 525797 foi combinado com doses subótimas de gemcitabina baseadas em experimentos prévios. A medição de crescimento de tumor (peso dos tumores removidos) foi feita 6 semanas após o enxerto do tumor.

[00177] Tumores ortotópicos tratados com EMD 525797 tinham tamanho e peso similar do que animais tratados com veículo de controle. Similarmente, gemcitabina, na dose subótima, não foi também ativa. Contudo, na mesma dosagem conforme os regimes monoterapêuticos, gemcitabina mais EMD 525797 tinham uma atividade sinérgica com uma redução de tumor de 52% (Figura 10).

Cisplatina/dacarbazina mais DI-17E6 em M21 humano ou modelos de xenoenxerto de melanoma de MeWO

[00178] Células de melanoma humanas M21 ou MeWo positivas para expressão de  $\alpha\beta 3$  integrina foram subcutaneamente inoculadas em SCID ou camundongos nus de acordo com protocolos-padrão bem-conhecidos.

[00179] DI-17E6 foi administrado sistemicamente junto com ou cisplatino (cPT) ou Dacarbazina (DTIC), dois quimioterapêuticos usados no tratamento clínico de melanoma.

[00180] DI-17E6 foi administrado i.p. uma vez por semana a partir do mesmo dia de s.c. injeção de célula de M21 ou MeWo nos animais em uma dose de manutenção semanalmente subótima de 27,2 mg/Kg (corresponde ca. 500  $\mu$ l/ml soro). DTIC foi administrado i.p. uma vez por semana a 50 mg/Kg, e cPT foi administrado i.p. uma vez por semana a 10 mg/Kg, cada um começando 11 dias após a injeção de célula de tumor.

[00181] Os resultados obtidos com cisplatina no modelo de xenoenxerto M21 é mostrado na Figura 11. Em contraste a dados *in vitro* mostrados anteriormente a combinação de cisplatina mais DI-17E6 *in vivo* induz claramente um aumento estatisticamente sinérgico signifi-

ficante em resposta comparado à administração de qualquer tratamento de fármaco sozinho.

[00182] Os resultados obtidos com DTIC no modelo de xenoenxerto de MeWo é mostrado na Figura 12. Em contraste a dados *in vitro* mostrados anteriormente, a combinação de cisplatina mais DI-17E6 *in vivo* induz claramente um aumento sinérgico estatisticamente significativo em resposta comparado à administração de qualquer tratamento de fármaco sozinho.

### **Exemplo 12**

[00183] *Teste in vivo de DI-17E6 em CAKI-1* de modelo de camundongo de xenoenxerto de carcinoma renal de CAKI-1 foram subcutaneamente inoculados em SCID ou camundongos nus de acordo com protocolos-padrão bem-conhecidos.

[00184] DI-17E6 foi administrado sistemicamente i.p. uma vez por semana a partir do mesmo dia de s.c. de injeção de célula de M21 ou MeWo em animais em doses diferentes.

Figura 13 mostra que, surpreendentemente, DI-17E6 pode reduzir volume/tamanho de tumor de baixa (1 µg/ml) para média (100 µg/ml soro) doses para aproximadamente o mesmo grau (nenhum efeito de dose real), pelo que administração de uma alta dose (500 µg/ml) conduz a uma redução completa de volume de tumor.

### **Exemplo 13:**

[00185] *Efeito combinatorial de DI-17E6 com cetuximab (Erbix®) em um modelo de xenoenxerto de carcinoma de célula renal de CAKI-1.*

[00186] A linhagem de célula de carcinoma de célula renal CAKI-1 foi crescida em RPMI contendo 10% de FCS (calor inativado) mais glutamina a 2 mM. Piruvato de sódio a 1 mM. 100 unidades/ml penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram passadas a confluência por lavagem uma vez em PBS livre de cátion, seguido por uma in-

cubação de 3 minutos em tripsina (0,5 µg/ml)/EDTA (0,2 µg/ml) de solução em PBS a 37°C. As células foram recuperadas e em meio, centrifugadas e retiradas do meio e contadas.

[00187] Os animais usados neste estudo foram fornecidos por HARLAN INTERFAUNA IBERICA S.L. (Sant Feliu de Codines (Barcelona) Espanha) e alojados durante o período de aclimação de um mínimo de 5 dias nos ambientes de quarentena em facilidades livres de patogenia específica.

[00188] Durante o período de aclimação, todas as observações foram registradas. Todos os animais foram inspecionados por um veterinário para assegurar a saúde dos animais.

[00189] O tratamento começou para todos os grupos no dia 0 de experimento (mesmo dia de injeção de célula).

[00190] Os animais foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com produto ou veículo a um volume de 10 mg/ml uma vez semanalmente para EMD 525797 e duas vezes semanalmente para Erbitux.

[00191] As dosagens de tratamento para EMD 525797 foram ajustadas para o soro esperado através de valores de 100 µg/ml. Para alcançar este soro através de valores, os animais foram dosados seguindo uma dose de condição simples de 17,1 mg/kg mais dose de manutenção múltipla (semanalmente) de 5,1 mg/kg de tabelamento conforme descrito na próxima tabela.

[00192] Todos os animais foram observados diariamente, controlando suas condições físicas, comportamento, presença de danos, e qualquer sinal clínico.

#### Grupos:

| Grupo | Substância administrada | Soro através de valor (µg/ml) | Dose de carregamento simples DI17E6 | Doses de manutenção Semanalmente (mg/kg) | Número do Animal |
|-------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--|------------------|
| A     | Veículo (PBS)           | 0                             | 0                                   | 0  | 10               |

| Grupo | Substância administrada | Soro através de valor ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Dose de carregamento simples DI17E6 | Doses de manutenção Semanalmente (mg/kg) | Número do Animal |
|-------|-------------------------|--|-------------------------------------|--|------------------|
| B     | DI17E6                  | 100  | 17,1                                | 5,1 (semanalmente)                       | 10               |
| C     | Erbitux                 | -  | 12                                  | 12 (bi-semanalmente)                     | 10               |
| D     | Erbitux                 | -  | 4                                   | 4 (bi-semanalmente)                      | 10               |
| E     | DI17E6+Erbitux          | 100  | 17,1/12                             | 5,1 (semanalmente)/12 (bi-semanalmente)  | 10               |
| F     | DI17E6 +Erbitux         | 100  | 17,1/4                              | 5,1 (semanalmente)/4 (bisemanalmente)    | 10               |

[00193] Os animais suportando tumores de xenoenxerto renais humanos CAKI-1 foram tratados com DI17E6, Erbitux ou a combinação de ambos começando no dia 0, quando as células de tumor foram inoculadas. A duração do tratamento para DI17E6 foi 40 dias e para Erbitux e os grupos de combinação 29 dias. O crescimento do tumor foi seguido até 111 dias após inoculação de célula de tumor. O tratamento com uma dose inicial de 17,1 mg/kg seguido por um tratamento semanalmente com 5,1 mg/kg de DI17E6 resultou em valores de 100  $\mu\text{g/ml}$  causando uma inibição de crescimento de tumor significativa no dia 40, o final de tratamento (T/C: 25 %).

[00194] Após o dia 40, um retardo de crescimento foi ainda observável até o final do período de observação. O tratamento duas vezes semanalmente com ou 4 mg/kg ou 12 mg/kg de Erbitux causou um efeito antitumor forte e significativo. T/Cs no dia 29, o final de tratamento foram 9%. Um efeito antitumor forte similar foi observado para ambas combinações DI17E6 mais 4 mg/kg de Erbitux 2/P e DI17E6 mais 12 mg/kg 2/P. T/Cs no dia 29, o final de tratamento, foram 10 % e 9 % (ver tabela 1) respectivamente.

[00195] Deve ser notado que 10  $\mu\text{g/ml}$  de soro/plasma corresponde a 0,55 mg/Kg de peso corpóreo.

[00196] Contudo, tumores nos grupos de tratamento com Erbitux sozinho começaram a crescerem novamente após parada de tratamento. Em contraste, em ambos os grupos de combinação a inibição do crescimento de tumor continuou aparente a partir da média de diminuição e tamanhos médios do tumor (Figura 14).

[00197] No final do período de observação em ambos grupos de combinação somente um dos tumores tinha alcançado o volume do dia 7, que representa o dia da primeira medição do tamanho do tumor.

[00198] Nos grupos de monotopia de Erbitux, 3 tumores cresceram a tamanhos consideráveis ( $> 1000 \text{ mm}^3$ ) e muitos deles cresceram a tamanhos acima do tamanho do tumor no dia 7.

[00199] Em geral todos os tratamentos foram bem-tolerados como indicado pelo ganho de peso durante o experimento. A redução de peso no grupo de veículo e no grupo tratado com DI17E6 em um dia de medição simples foi mais provavelmente causado por uma falta de suprimento de água. Em ambos os grupos relevantes, a redução de peso foi reversível seguido por um ganho de peso.

[00200] O tratamento com uma dose inicial de 17,1 mg/kg seguido por uma dose semanalmente de 5,1 mg/kg DI17E6 que conduz a valores de 100 ug/ml durante o período de tratamento causou uma inibição significativa de crescimento de tumores CAKI-1 renais humanos. Também tratamento simples com duas doses diferentes de Erbitux usando uma tabela bi semanalmente causou inibição significativa de crescimento de tumor. Ambas as doses de Erbitux foram aproximadamente e igualmente potentes em sua atividade antitumor. A combinação de DI17E6 com ou 4 mg/kg de Erbitux ou 12 mg/kg de Erbitux causou também um efeito antitumor potente, que é comparável aos tratamentos de Erbitux simples durante o período de tratamento.

[00201] Contudo, a diferença entre as monoterapias de Erbitux e os tratamentos de combinação é o comportamento de crescimento após a

parada de tratamento no dia 29. Considerando-se 82 dias após parada de tratamento somente, um dos tumores no grupo de combinação cresceu ao tamanho do dia 7, o primeiro dia das medições do tamanho do tumor, que significa que os tumores tratados com DI17E6 e Erbitux ou regrediram ou mostraram doença estável.

[00202] Em contraste, nos dois grupos tratados somente com Erbitux, parada de tratamento a tamanhos consideráveis (variando de 429 a 3581mm<sup>3</sup>) indicando que a combinação de DI17E6 e Erbitux pode prevenir relapso de crescimento de tumor após tratamento com Erbitux.

[00203] O efeito sinérgico forte de DI-17E6 no tratamento com inibidores de tirosina quinase, tal como cetuximab (Erbitux®), pode estar relacionado como extraordinário e abre o campo para uma terapia de combinação de tumor promissora.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo híbrido anti- $\alpha$ v-integrina recombinante projetado, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) as regiões de cadeia leve:

CDR1. RASQDISNYLA,

CDR2: YTSKIHS,

CDR3: QQGNTFPYT;

(ii) as regiões de cadeia pesada:

CDR1: SFWMH,

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD,

CDR3: FLGRGAMDY;

(iii) as regiões de estrutura de cadeia leve:

FR-1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC,

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY,

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYFTFISLQPEDATYYC,

FR-4: FGQGTKVEIK;

(iv) as regiões de estrutura de cadeia pesada:

FR1: QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFS,

FR2: WVRQAPGQGLEWIG,

FR3: KATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS,

FR4: WGQGTSVTVSS; e

(v) uma região constante de cadeia pesada derivando de IgG humano e uma região de cadeia leve constante humana, em que no referido anticorpo projetado

(vi) a região constante de cadeia pesada deriva de IgG2,

(vii) a referida região constante de IgG2 compreende uma região de articulação de IgG1 modificada,

(viii) a referida região articulada de IgG1 modificada compreende a sequência EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 24),

(ix) a referida região constante de IgG2 é modificada por substi-

tuição de aminoácido N para Q na posição 297, e

(x) o resíduo de aminoácido F, na posição 296, é substituído por A.

2. Anticorpo projetado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região constante de cadeia leve é capa humana.

3. Anticorpo híbrido anti- $\alpha$ v-integrina recombinante, caracterizado pelo fato de que consiste em:

(i) sequências de cadeia leve constantes e variáveis:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAP -  
 KLLIYYTSKIHSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDI -  
 ATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG -  
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS -  
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC; e

(ii) sequências de cadeia pesada constantes e variáveis:

QVQLQQSGGELAKPGASVKVCKASGYTFSSFWMHWVR -  
 QAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAY -  
 MELSSLRSEDVAVYYCASFLGR -  
 GAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKP -  
 SNTKVDKTVEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS -  
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK -  
 TKPREEQAQSTFRVVSVLTQVVDLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK -  
 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI -  
 AVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSM -  
 HEALTHHNYTQKSLSLSPGK.

4. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, fundidas em seu C-terminal a uma citocina ou fator de crescimento.

5. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo ou proteína de fusão de anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em uma quantidade farmacologicamente eficaz, opcionalmente junto com um veículo, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro e segundo agente terapêutico farmacologicamente eficaz, em que o primeiro agente é um anticorpo ou proteína de fusão de anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e o segundo agente é selecionado a partir do grupo consistindo de: Taxol, Etoposídeo, 5FU, Cisplatina, Melfalano, Doxorubicina, Camptotecina, Vincristina, Gemcitabina, Estramustina, Temozolomida, Paclitaxel, Vinblastina, Dacarbazina (DTIC), Cilengitida and Cetuximab (Erbix®), opcionalmente junto com um veículo, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o segundo agente é cetuximab.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o inibidor de angiogênese é o inibidor de integrina cilengitida.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o agente quimioterapêutico é cisplatina, DTIC ou dacarbazina.

10. Anticorpo projetado ou proteína de fusão de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de tumores sólidos ou metástases de tumor.

11. Anticorpo projetado de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o efeito no crescimento do tumor é independente do efeito antitumor indireto do referido anticorpo causado

por sua efeito bloqueador de angiogênese.

12. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 9, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de tumores.

13. Composição farmacêutica para uso no tratamento de tumores, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro e um segundo agente terapêutico farmacêuticamente eficaz, em que o primeiro agente terapêutico é o anticorpo projetado como definido na reivindicação 3, e o segundo agente terapêutico é o anticorpo anti-EGFR cetuximab.

**Fig 1A**

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S  
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCAAGT  
 Q D I S N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S  
 CAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTACACATCA  
 K I H S G V P S R F S G S G S G T D Y T F T I S S L  
 AAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACACCTTACCATCAGCAGCCTC  
 Q P E D I A T Y Y C Q Q G N T F P Y T F G Q G T K V  
 CAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTG  
 E I K (SEQ ID No. 1)  
 GAAATCAAA

**Fig 1B**

Q V Q L Q Q S G G E L A K P G A S V K V S C K A S G  
 CAGGTCCAGCTTACAGAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGC  
 Y T F S S F W M H W V R Q A P G Q G L E W I G Y I N  
 TACACCTTAGTAGTCTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT  
 P R S G Y T E Y N E I F R D K A T M T T D T S T S T  
 CCTAGACTGGTTATACTAGTATAATGAGATATTCAGGGACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACA  
 A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A S F L G R G A  
 GCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCT  
 M D Y W G Q G T T V T V S S (SEQ ID No. 2)  
 ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCA

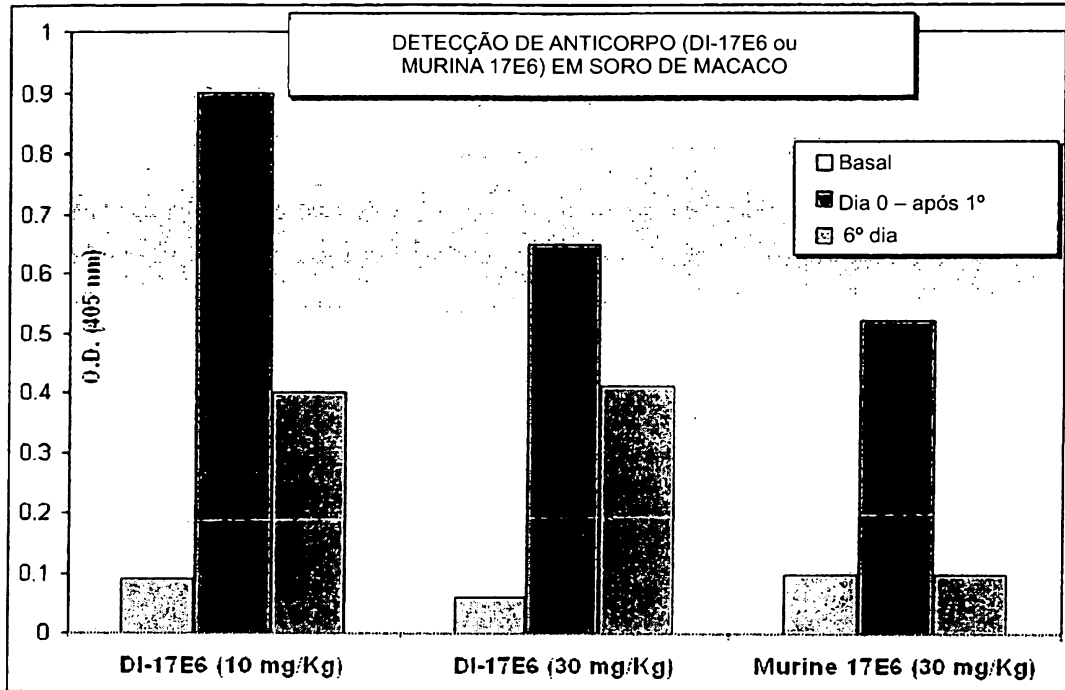
**Fig 1C**

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDISNYLAWYQOKPGKAPKLLIYYTSKIHSGVPS  
RFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID No. 3)

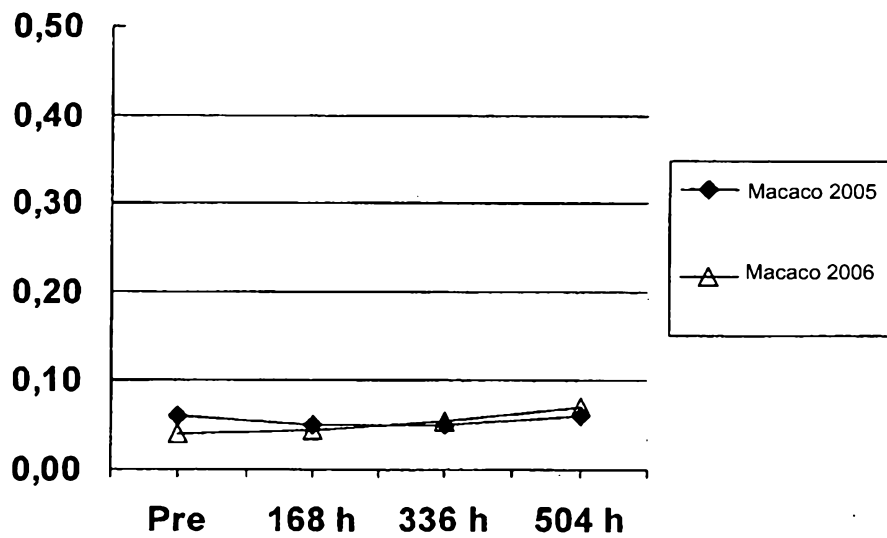
**Fig 1D**

QVQLQDSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWVRQAPGQGLEWIGYINP  
RSQYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDY  
WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQGTQYTCNVDPKPSNTKVDKTV  
EPKSSDKTHHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVS  
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No. 4)

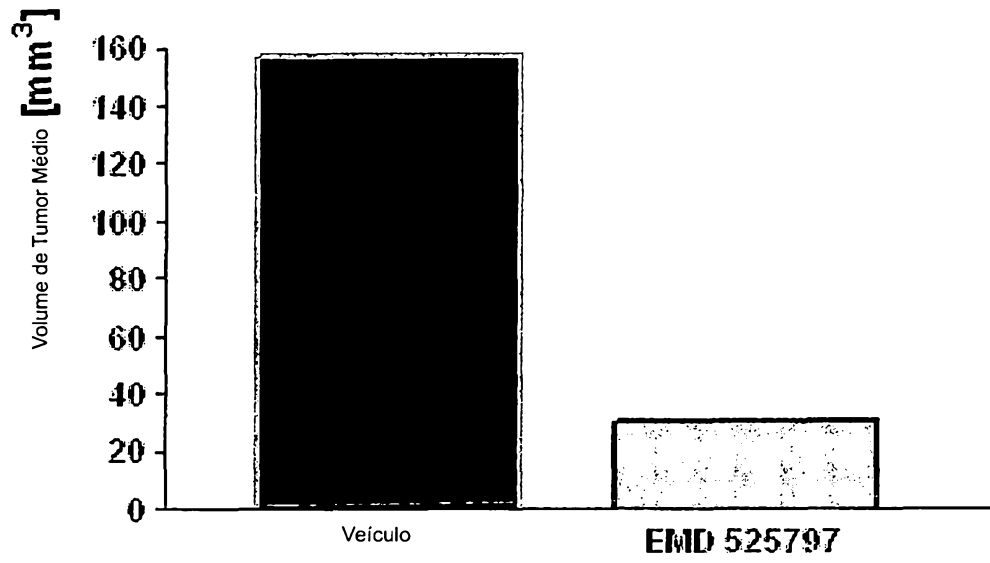
**Fig 2**



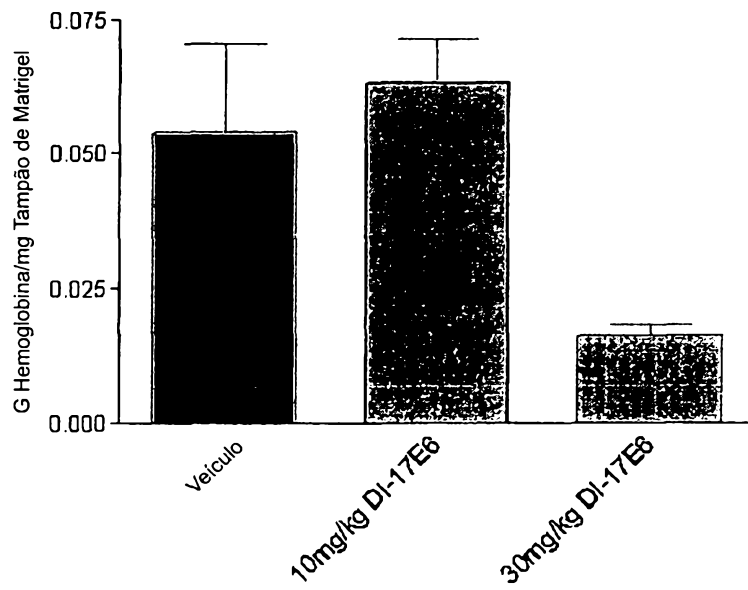
**Fig 3**

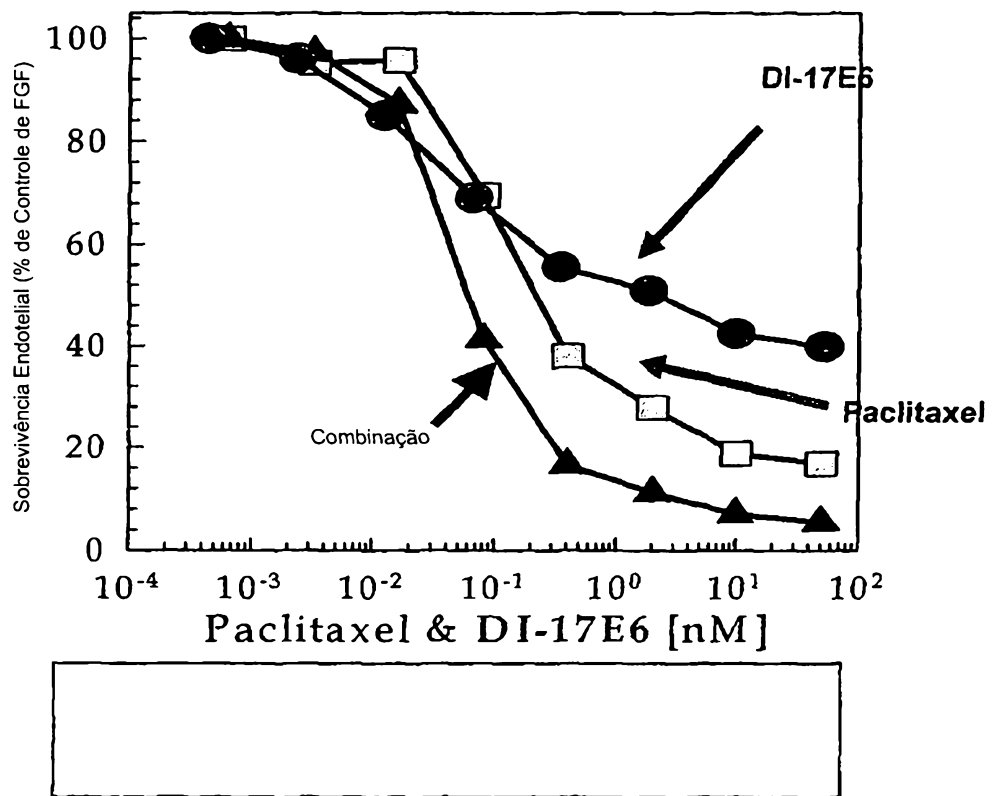


**Fig 4:**



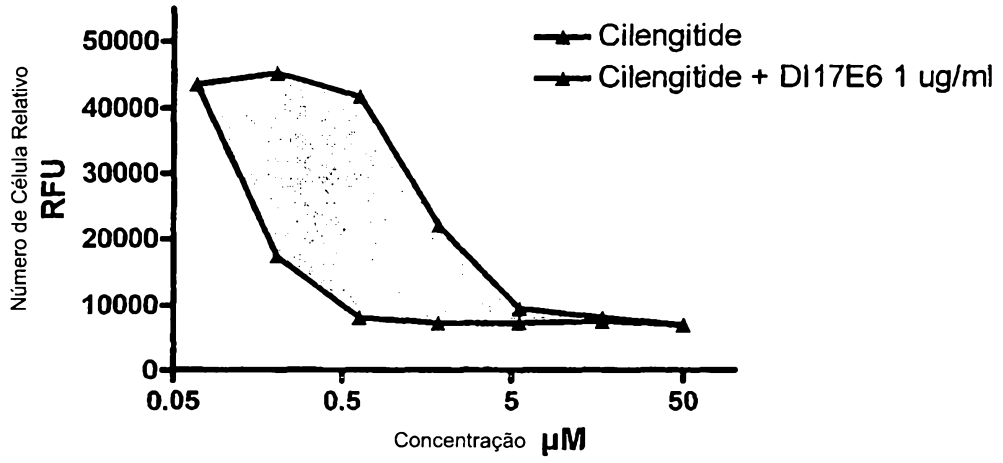
**Fig 5:**



**Fig 6:**

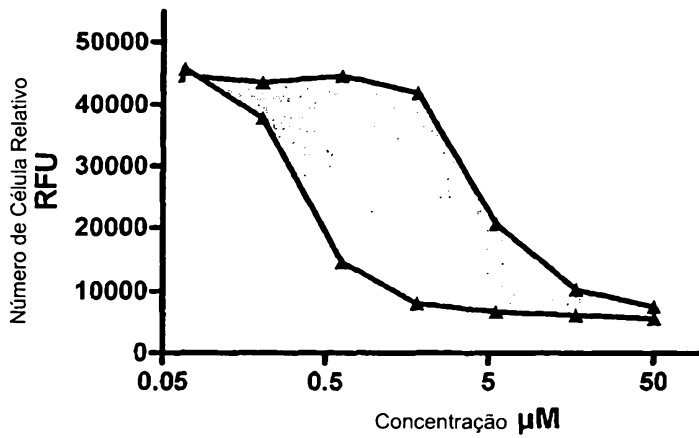
**Fig 7:**

Células M21

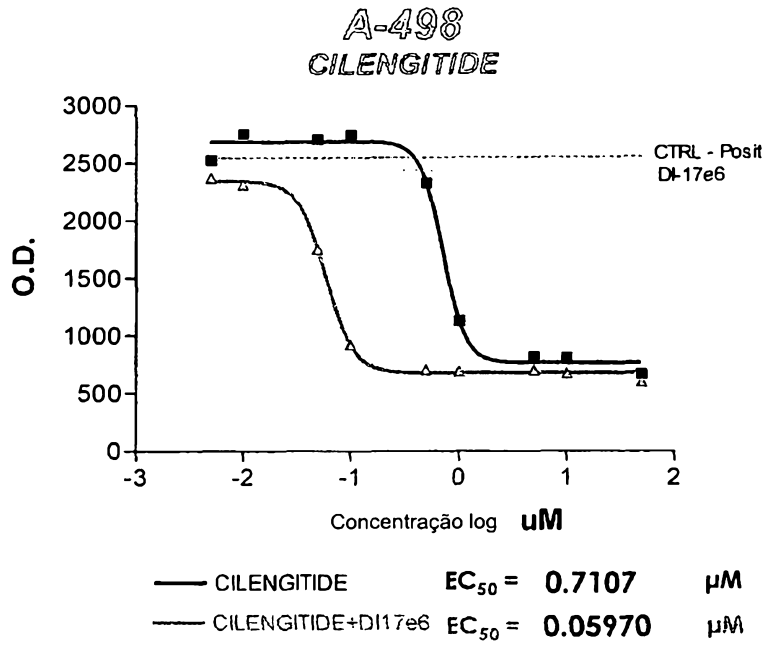


**Fig 8:**

Células CAKI-2



**Fig 9:**



**Fig 10:**

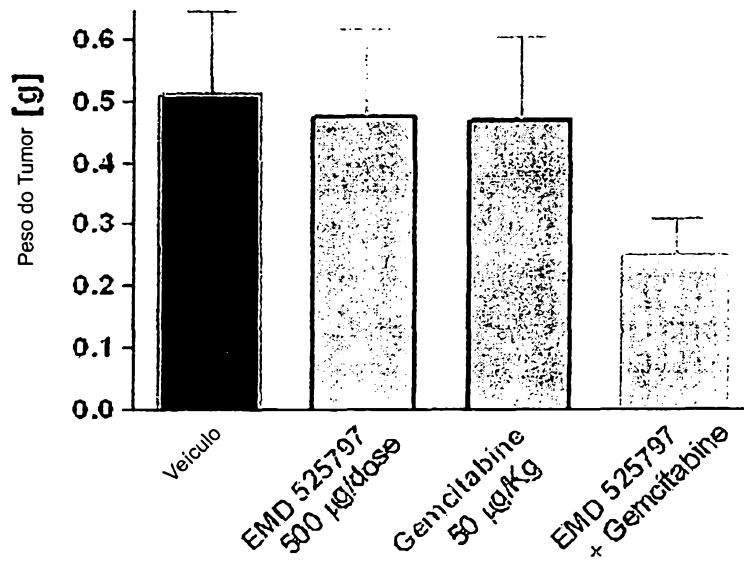


Fig 11:

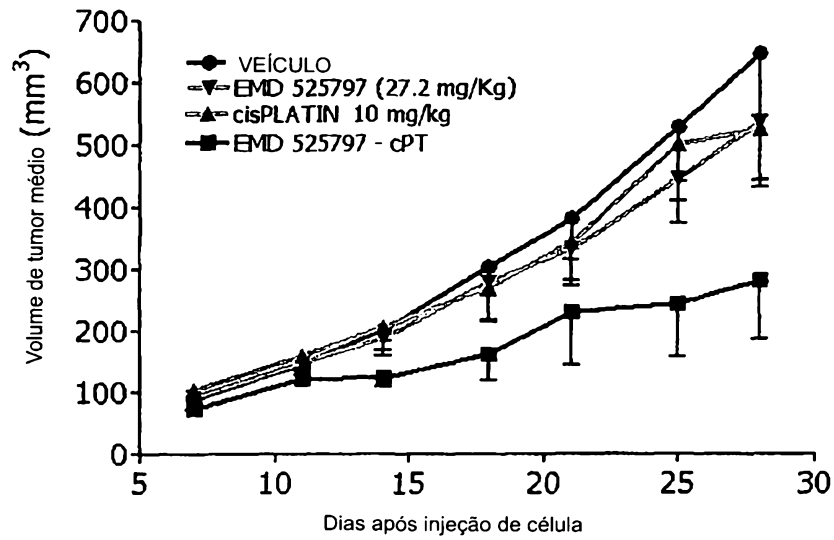
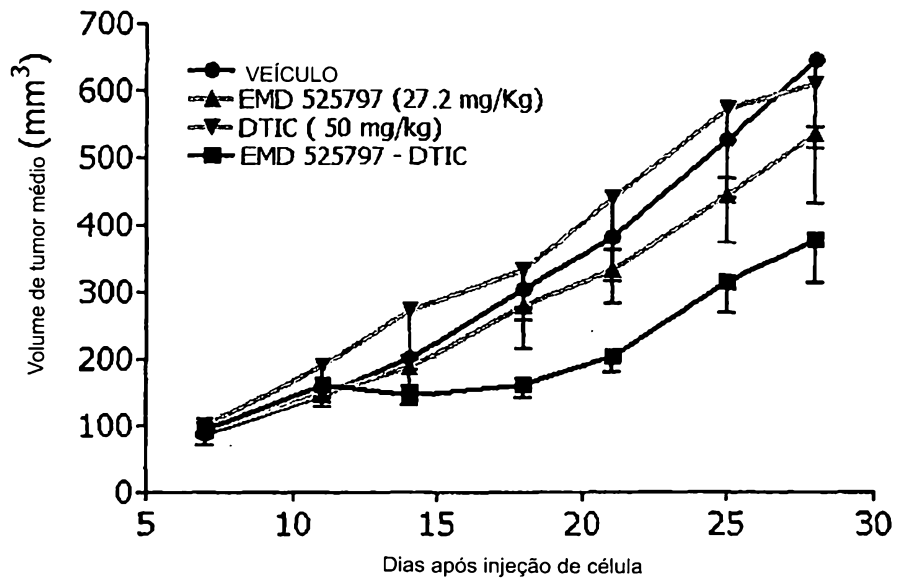
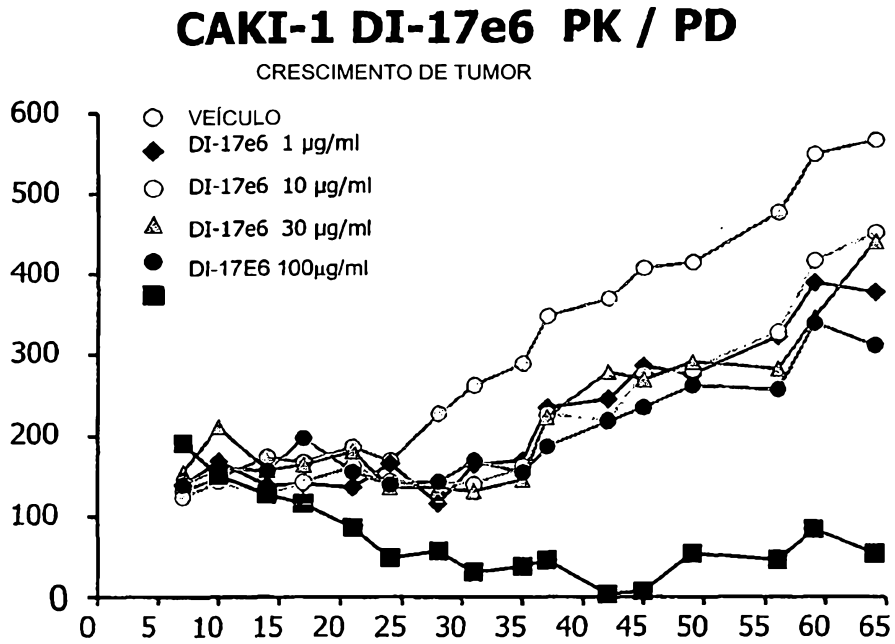


Fig 12:



**Fig 13:**



**Fig 14:**

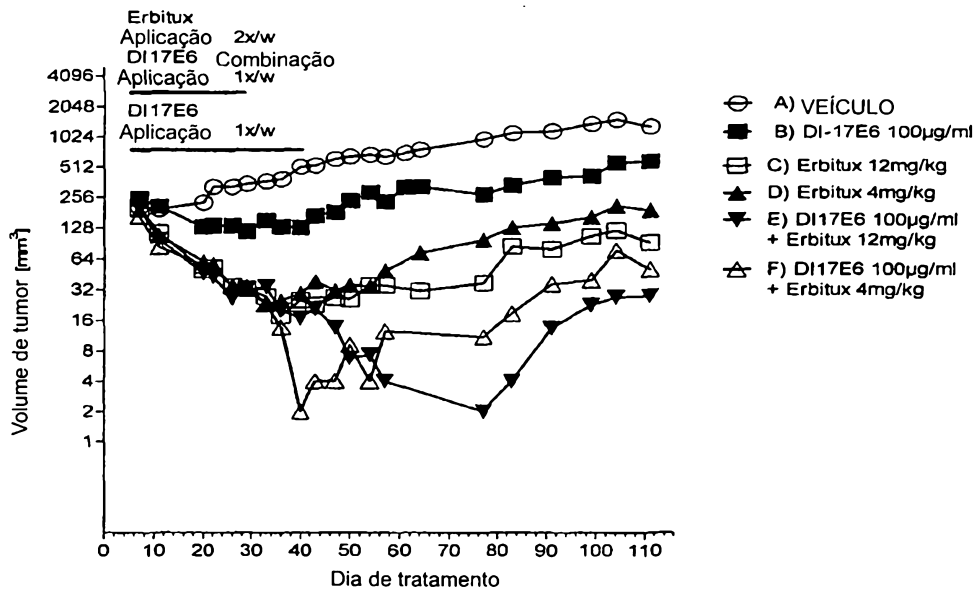


Fig 15

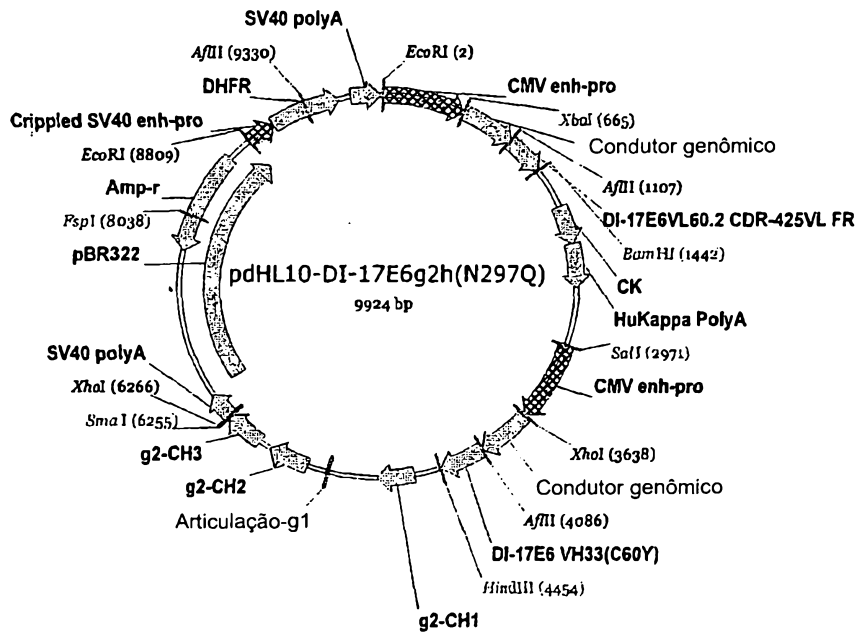


Fig 16

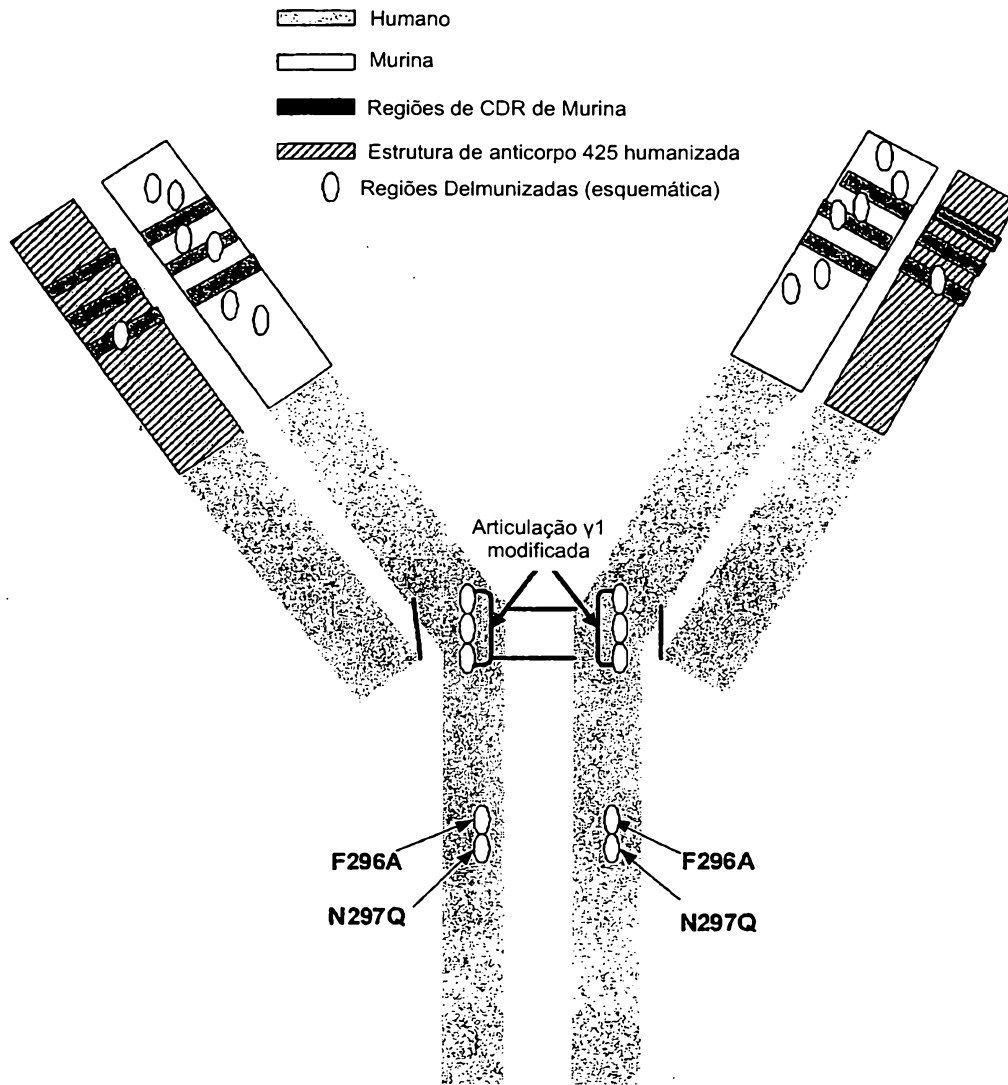


Fig 17A

ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGgtgaggagagaggggaagtg  
 agggaggagaatggacagggagcaggagcactgaatcccattgctcattccatgtattctggcat  
 gggtagaagatgggtccttatcctccagcatggggcctctggggtgaatacttgtagagggagg  
 ttccagatgggaacatgtgctataatgaagattatgaaatggatgcctgggatggtctaagtaat  
 gcctagaagtgactagacacttgcaattcacttttttgtaagaagagatttttaggctataaa  
 aaaatggtatgtaaaaaataaacatcacagttgaaataaaaaaaaaatataaggatggtcattgaatt  
 ttgtgtataactatgtatttctctctcattgtttcagCTTCCTTAAGCGACATCCAGATGACCCA  
 GAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCAAGTCAGG  
 ACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTAC  
 TACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTACGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTA  
 CACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGGGTAATA  
 CGTTTCCGTACACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACgtaagtggatcccgaattc  
 taaactctgagggggctcgatgacgtggccattctttgcctaaagcattgagtttactgcaaggt  
 cagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagctccaacaaaaaatttagaacttta  
 ttaaggaatagggggaagctaggaagaaactcaaacatcaagattttaataacgcttcttggtc  
 tccttgctataattatctgggataagcatgctgttttctgtctgtccctaacaatgcctgtgatt  
 atccgcaaacaacacacccaagggcagaactttgttacttaaacaccatcctgtttgcttctttc  
 ctgagGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG  
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG  
 GTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG  
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG  
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
 TAG           SEQ ID No. 27

Fig 17B

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC  
 CTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTC  
 CAAAGCTGCTGATCTACTACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTACGCGGTAGC  
 GGTAGCGGTACCGACTACACCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTA  
 CTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA  
 SEQ ID No. 29

Fig 17C

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  
 TGCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG  
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC  
 TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG  
 CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
 SEQ ID No. 31

Fig 18A

ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGgtgaggagagaggggaagtg  
 agggaggagaatggacagggagcaggagcactgaaatcccattgctcattccatgtattctggcat  
 gggtgagaagatgggtcttatacctccagcatggggcctctgggggaataactgttagagggagg  
 ttccagatgggaacatgtgctataatgaagattatgaaatggaagcctgggatgggtctaagtaat  
 gcctagaagtgactagacacttgcaattcacttttttgtaagaagagatttttaggctataaa  
 aaaatggtatgtaaaaaataacatcacagttgaaataaaaaaaatataaggatgttcatgaatt  
 ttgtgtataactatgtatttctctctcattgtttcagCTTCCTTAAGCCAGGTCCAGCTTCAGCA  
 GTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACA  
 CCTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGA  
 TACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGGGACAAGGCCACAATGAC  
 TACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAG  
 TCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACCGTC  
 ACCGTCTCTCAGgtgagtaagctttctggggcgagccgggctgactttggctttggggcaggg  
 agtgggctaaggtgaggcaggtggcgccagccaggtgcaacccaatgcccgtgagcccagacac  
 tggaccctgcctggaccctcgtggatagacaagaaccgaggggctctgcccctgggcccagctc  
 tgtcccacaccgcggtcacatggcaccacctctcttgcagCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTT  
 CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG  
 ACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCTGCACACC  
 TTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG  
 CAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACA  
 AGACAGTTGgtgagaggccagctcagggagggaggggtgtctgctggaagccaggtcagccctcc  
 tgctggacgcacccccggctgtgagccccagcccagggcagcaaggcaggccccatctgtctcc  
 tcacccggaggcctctgcccgccccactcatgctcagggagagggctcttctggctttttccacca  
 ggctccaggcaggcacaggtgggtgcccctaccccaggcccttcacacacaggggcaggtgctt  
 ggctcagacctgcaaaaagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaaagccgacccccaaag  
 ccaaactgtccactccctcagctcggacacctctctctctcccagatccgagtaactcccactct  
 tctctctgcag**AGCCCAAATCTTCTGACAAA**ACTCACACATGCCACCGTGCCCAggtaaagccag  
 ccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgcccctagagtagcctgcatccagggacag  
 gccccagctgggtgctgacacgtccacctccatctcttctcctcagCACCACCTGTGGCAGGACCGT  
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAG  
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGT  
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCA  
 GCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC  
 AAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGgtgggaccgcggggtatg  
 agggccacatggacagaggcggctcgcccaccctctgcccctgagagtgaccgctgtaccaacc  
 tctgtccctacagGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGAT  
 GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGG  
 AGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC  
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT  
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCC  
 CGGGTAAATGA  
 SEQ ID No. 33

Fig 18B

CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTG  
CAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGG  
GTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGG  
GACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAG  
ATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGG  
GTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCA SEQ ID No. 35

Fig 18C

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCAC  
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAG  
GCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC  
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA  
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACAT  
**GCCCACCGTGCCCA**GCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCCAAG  
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA  
CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCAC  
GGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGG  
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC  
CATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGG  
AGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC  
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTC  
CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG  
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG  
TCCCCGGGTAAA SEQ ID No. 37

Fig 18D

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA SEQ ID No. 39

Fig 19A

CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTG  
 CAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGG  
 GTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGG  
 GACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAG  
 ATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGG  
 GTC AAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG  
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCC  
 CGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTG  
 TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGC  
 ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGA  
**GCCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGT**  
 CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACG  
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGT  
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCA  
 GCGTCTCACCCTGTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC  
 AAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA  
 GGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGG  
 TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC  
 TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA  
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA SEQ ID No. 41

Fig 19B

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC  
 CTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTC  
 CAAAGCTGCTGATCTACTACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGC  
 GGTAGCGGTACCGACTACACCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTA  
 CTGCCAACAGGGTAATACGTTTTCCGTACACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAA  
 CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC  
 TCTGTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA  
 GCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA  
 GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA  
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
 SEQ ID No. 43

Fig 20A

DIQMTQTTSSLSASLGDRV I I **SCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIFYTSKLH**  
 SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFC**QQGNTFPYTF**GGGTVKVMR  
 (SEQ ID No. 25):

Figure 20B

QVQLQQSGAELAE PGASVKMSCKASGYTFS**SFWMHWKQ**RPQGLEWIG**YINPRS**  
**GYTECNEIFRDK**ATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAS**FLGRGAMDY**WGQ  
 GTSVTVSS (SEQ ID No. 26):

Fig 21A

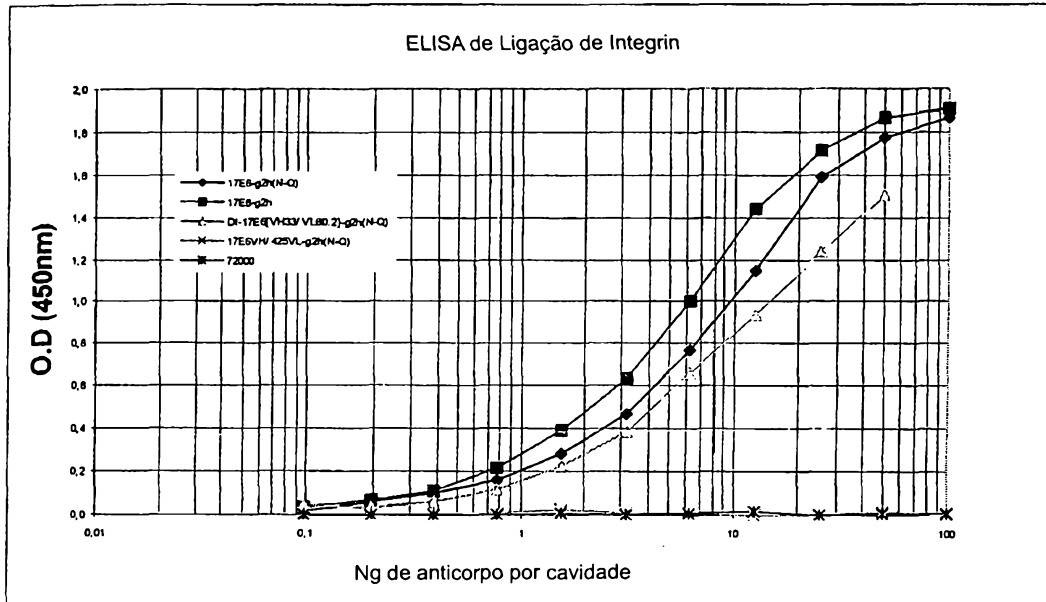


Figure 21B

