



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

(11) PI 0915928-2 B1



(22) Data do Depósito: 15/07/2009

(45) Data de Concessão: 20/10/2020

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO OU PROTEÍNA FUNCIONAL E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 37/06; A61P 19/02.

(30) Prioridade Unionista: 15/05/2009 EP 09 160326.6; 17/07/2008 EP 08 160671.7.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): CHRISTOPH HEUSSER; JULIA NEUGEBAUER; EVELINE SCHAADT; STEFANIE URLINGER; MAXIMILIAN WOISETSCHLAEGER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009059030 de 15/07/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/007082 de 21/01/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/01/2011

(57) Resumo: ANTICORPO ISOLADO OU PROTEÍNA FUNCIONAL, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO OU CLONAGEM, E CÉLULA HOSPEDEIRA. A presente invenção se refere aos anticorpos que especificamente se ligam ao receptor de BAFF (BAFFR). A invenção mais especificamente refere-se aos anticorpos específicos que são antagonistas de BAFFR com atividade de depleção de célula B in vivo e composições de métodos de uso para os referidos anticorpos para tratar distúrbios patológicos que possam ser tratados exterminando-se ou depauperando-se as células B, tal como lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide ou outras doenças imunes ou linfomas, leucemias e mielomas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO ISOLADO OU PROTEÍNA FUNCIONAL E
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO OS
MESMOS".**

[0001] A presente invenção refere-se a anticorpos que especificamente se ligam ao receptor de BAFF (BAFFR). A invenção mais especificamente refere-se a anticorpos específicos que são antagonistas de BAFFR com atividade de depleção de célula B *in vivo* e composições e métodos de uso para os referidos anticorpos para tratar distúrbios patológicos que podem ser tratados matando-se ou por depleção das células B, tal como lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide ou outras doenças imunes ou linfomas, leucemias e mielomas.

[0002] BAFFR (também conhecido como BR3, TNFRSF13C, ou CD268) é um membro da superfamília do receptor de fator de necrose de tumor. Ele é expresso predominantemente em B-linfócitos e em um subgrupo de Células T. BAFFR especificamente liga o membro da família de fator de necrose de tumor BLyS (também conhecido como BAFF, CD257, TALL-1, THANK, TNFSF13B, ZTNF4) que pode ser expressado por uma variedade de tipos diferentes de célula, mais notavelmente células mieloide. Funcionalmente, o par de ligante-receptor BLyS /BAFFR está criticamente envolvido na maturação de células B transitórias imaturas e para sobrevivência, migração e ativação de células B maduras, incluindo mudança de classe de isótipo. BLyS pode agir sozinho ou em conjunto com o receptor de célula B (BCR), interleucina-4, interleucina-21 ou ligante CD40. Devido a presença de BAFFR em algumas Células T, BLyS pode agir como um fator coestimulador para ativação de célula T. BLyS pode também se ligar a dois receptores adicionais encontrados em células B, TACI e BCMA.

[0003] A superexpressão de BLyS ou BAFFR em camundongos leva a hiperplasia de célula B e desenvolvimento de autoimunidade sistêmica com características clássicas de lúpus eritematoso sistêmico (SLE). Além disso, camundongos (NZBxNZW)F1 e MRL-lpr/lpr autoimunes que representam modelos animais de SLE contêm concentrações de BLyS aumentadas no soro e os níveis de BLyS se correlacionam com a progressão da doença. Os níveis aumentados de BLyS são também encontrados em pacientes humanos que sofrem de SLE, artrite reumatoide, Síndrome de Sjögren, Granulomatose de Wegener e Malignidades de Célula B. Além disso, o fenótipo da doença em modelos animais de doenças autoimunes tais como artrite reumatoide (por exemplo artrite induzida por colágeno), SLE e esclerose múltipla (por exemplo, encefalomielite autoimune experimental) pode ser parcialmente revertido por bloqueio de BLyS com proteínas de fusão de receptor solúveis. Similarmente, o tratamento com proteína de fusão BAFFR:Fc inibe a doença do enxerto *versus* hospedeiro crônica (cGVHD) bloqueando-se a sobrevivência de célula B. Os dados de eficácia clínica com um anticorpo anti-BLyS bloqueador em pacientes de artrite reumatoide e SLE enfatizam a função patogênica de BLyS nestes distúrbios autoimunes.

[0004] A sinalização induzida por BLyS também parece estar envolvida na sobrevivência de células B malignas. A apoptose de células B-CLL pode ser resgatada pela adição de BLyS ou APRIL recombinante. Inversamente, a apoptose de células B-CLL é aumentada adicionando-se proteínas de fusão de BAFFR solúveis ou por anticorpos anti-APRIL, indicando que BLyS e APRIL poderiam servir como fatores de crescimento autócrino para células B malignas. BAFFR é expresso em uma variedade de tecidos doentes incluindo mieloma múltiplo e linfoma de não Hodgkin. Os tratamentos atualmente disponíveis para estas doenças imunes são imunossupressores com

efeitos colaterais severos que não curam a doença, porém têm como objetivo a melhora dos sinais e sintomas da doença (fármacos de modificação de doença). A maioria dos imunossupressores atualmente usada em SLE e RA como os corticosteroides, ciclofosfamida, metotrexato e azatioprina levam a efeitos anti-inflamatórios gerais que carregam o risco de infecções severas uma vez que afetam todas as ramificações efectoras do sistema imune. Portanto, ainda há uma necessidade de composições e métodos para tratar SLE e/ou RA e outras doenças imunes relacionadas, tais como agentes que interferem com a sinalização de BAFFR na qual BLyS é suspeito de contribuir com a doença.

[0005] Portanto, em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno do referido anticorpo para um alvo no polipeptídeo de BAFFR (SEQ ID NO:87), caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou proteína funcional especificamente se liga ao polipeptídeo de BAFFR. Em uma modalidade, o anticorpo ou proteína funcional é de um mamífero, tendo uma origem tal como humana ou camélídeo, ou é um anticorpo humanizado. Em uma modalidade particular, o anticorpo anti-BAFFR é caracterizado como tendo região de ligação de antígeno que é específica para a proteína-alvo BAFFR e se liga ao BAFFR ou um fragmento de BAFFR.

[0006] Em uma modalidade, os anticorpos de acordo com a invenção são antagonistas de BAFFR com nenhuma ou baixa atividade agonística. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento funcional liga a proteína-alvo BAFFR e diminui ou inibe a ligação de BLyS ao BAFFR. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo ou fragmento funcional inibe a proliferação de célula B humana induzida por BLyS, e/ou produção de IgG1.

[0007] Em outra modalidade, os anticorpos de acordo com a

invenção depauperam a célula B *in vitro* e *in vivo*. Mais preferivelmente, os anticorpos da invenção são antagonistas de BAFFR com nenhuma atividade agonística e depauperam a célula B humana *in vitro* e *in vivo*.

[0008] A ligação pode ser determinada por um ou mais ensaios que podem ser usados para medir uma atividade que é ou antagonismo ou agonismo pelo anticorpo. Preferivelmente, os ensaios medem pelo menos um dos efeitos do anticorpo em BAFFR que inclui: Produção de célula B humana induzida por BLyS, Produção de IgG1 e/ou atividade de depleção de célula B humana.

[0009] Em outra modalidade, a invenção fornece anticorpos que especificamente se ligam a região de ligação de BLyS de BAFFR. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece anticorpos que se ligam a uma região de BAFFR entre os aminoácidos 17 e 43 de SEQ ID NO:87 e por exemplo, se liga pelo menos a PTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLR (SEQ ID NO 88).

[00010] De acordo com outra modalidade particular, os anticorpos se ligam ao BAFFR com um K_D de 100nM ou menos, 10nM ou menos, 1nM ou menos, inibem a produção de célula B humana induzida por BLyS com um IC_{50} em cerca de 10nM ou menos, 1nM ou menos ou 100pM ou menos e depauperam as células B *in vitro* com um EC_{50} de 10nM ou menos, 1nM ou menos ou 100pM ou menos.

[00011] Em outra modalidade relacionada, os anticorpos reduzem a porcentagem de células B no sangue e tecido *in vivo* até 70%, preferivelmente 80%, e mais preferivelmente 90% em um modelo de camundongo quando comparado com animais de controle não tratados.

[00012] Em algumas modalidades particulares, os anticorpos da invenção não reagem cruzado com uma proteína relacionada de BAFFR, e mais particularmente não reagem cruzado com o receptor de TACI ou BCMA humano.

[00013] Em outra modalidade relacionada, os anticorpos de acordo

com a invenção são anticorpos completamente humanos ou de IgG1 humanizados com atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e se ligam a uma região de BAFFR compreendida entre os aminoácidos 17 e 43 de SEQ ID NO:87, e por exemplo, pelo menos os seguintes peptídeos PTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLR (SEQ ID NO 88) e depauperam as células B *in vitro* com um EC₅₀ de 10nM ou menos, 1nM ou menos ou 100pM ou menos.

[00014] Em outra modalidade relacionada, os anticorpos de acordo com a invenção são anticorpos humanos produzidos por expressão recombinante em uma linhagem de célula sem fucosiltransferase, por exemplo, uma linhagem de célula de mamífero com expressão deficiente do gene FUT8 codificando fucosiltransferase, desse modo aumentando a atividade de ADCC quando comparado com as células do tipo selvagem expressando o gene FUT8.

[00015] A presente invenção refere-se aos anticorpos isolados, particularmente anticorpos humanos ou humanizados, que interferem com, a diminuição ou inibição de ligação de BLyS ao BAFFR e que depauperam células B *in vitro* e *in vivo*. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são derivados de sequências de cadeia longas e curtas particulares e/ou compreendem características estruturais particulares tais como as regiões CDR que compreendem sequências de aminoácido particulares. A invenção fornece anticorpos isolados, métodos de preparação de tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas multivalentes ou multiespecíficas que compreendem tais anticorpos e composições farmacêuticas contendo os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. A invenção também se refere aos métodos de uso dos anticorpos para inibir, por exemplo, antagonizar, a função de BAFFR para retardar, prevenir, prevenir o início de, ou inibir o desenvolvimento de um distúrbio ou condição associado à presença de BLyS e/ou BAFFR, por exemplo,

resultando no tratamento de um distúrbio patológico que é mediado por BAFFR ou que possa ser tratado por morte ou depleção de células B; por exemplo, uma doença autoimune tal como lúpus eritematoso sistêmico (SLE) ou artrite reumatoide (RA) ou neoplasma de célula B tais como linfomas, leucemias ou mielomas. Desse modo, tais anticorpos, fragmentos de anticorpo ou proteínas de ligação de antígeno podem encontrar uso profilaticamente, preventivamente, ou como parte de um método de tratamento.

[00016] Para que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

[00017] O termo "resposta imune" refere-se à ação de, por exemplo, linfócitos, células de apresentação de antígeno, células fagocíticas, granulócitos, e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta em dano seletivo, destruição, ou eliminação do corpo humano de patógenos invasores, células ou tecidos infectados com patógenos, células cancerosas, ou, em casos de autoimunidade ou inflamação patológica, tecidos ou células humanas normais.

[00018] Uma "série de reações de transdução de sinal" ou "atividade de sinalização" refere-se a uma relação causal bioquímica geralmente iniciada por uma interação de proteína-proteína tal como a ligação de um fator de crescimento a um receptor, resultando na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. Em geral, a transmissão envolve a fosforilação específica de um ou mais resíduos de tirosina, serina ou treonina em uma ou mais proteínas nas séries de reações causando transdução de sinal. Os penúltimos processos tipicamente incluem eventos nucleares, resultando em uma alteração na expressão de gene.

[00019] O termo BAFFR ou receptor de BAFF refere-se a BAFFR

humano como definido na SEQ ID NO: 87. Publicações de Patente PCT WO200004032 e WO2006073941 referem-se aos anticorpos anti-BAFFR em geral. WO2006073941 descreve anticorpos anti-BAFFR específicos.

[00020] O termo "anticorpo" como referido aqui inclui anticorpos totais e qualquer fragmento de ligação de antígeno (isto é, "porção de ligação de antígeno") ou cadeias únicas dos mesmos. Um "anticorpo" de ocorrência natural é uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias longas (H) e duas cadeias curtas (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia longa é compreendida de uma região variável de cadeia longa (abreviado aqui como V_H) e uma região constante de cadeia longa. A região constante de cadeia longa é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia curta é compreendida de uma região variável de cadeia curta (abreviado aqui como V_L) e uma região constante de cadeia curta. A região constante de cadeia curta é compreendida de um domínio, C_L. As regiões V_H e V_L podem ser também subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões de determinação de complementariedade (CDR), intercaladas com as regiões que são mais conservadas, chamadas regiões de estrutura (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs dispostos do terminal de amino ao terminal de carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias longas e curtas contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

[00021] O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de antígeno"), como usado aqui, refere-se ao

tamanho natural ou um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de especificamente se ligar a um antígeno (por exemplo, uma porção de BAFFR). Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de tamanho natural. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos no termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem um fragmento de Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios V_L , V_H , C_L e $CH1$; um fragmento $F(ab)_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de articulação; um fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e $CH1$; um fragmento Fv consistindo nos domínios V_L e V_H de uma ramificação única de um anticorpo; um fragmento dAb (Ward e outros, 1989 Nature 341:544-546), que consiste em um domínio de V_H ; e uma região de determinação de complementariedade (CDR) isolada.

[00022] Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados pelos genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que os permitem serem feitos como uma cadeia de proteína única na qual as regiões de V_L e V_H se unem para formar moléculas monovalentes (conhecido como Fv de cadeia única (scFv); vide, por exemplo, Bird e outros, 1988 Science 242:423-426; e Huston e outros, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única são também pretendidos serem abrangidos no termo "região de ligação de antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas por aqueles de experiência na técnica, e os fragmentos são avaliados quanto à utilidade da mesma maneira como são os anticorpos intactos.

[00023] Um "anticorpo isolado", como usado aqui, refere-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo

isolado que especificamente liga BAFFR é substancialmente livre de anticorpos que especificamente liga antígenos exceto BAFFR). Um anticorpo isolado que especificamente liga BAFFR pode, entretanto, ter reatividade cruzada com outros antígenos, tais como moléculas de BAFFR de outras espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular material e/ou substâncias químicas.

[00024] Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" como usados aqui se referem a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma afinidade e especificidade de ligação única para um epítipo particular.

[00025] O termo "anticorpo humano", como usado aqui, é pretendido incluir anticorpos tendo regiões variáveis nas quais ambas as regiões de estrutura e CDR são derivadas de sequências de origem humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada de tais sequências humanas, por exemplo, sequências de linha germinativa humana, ou versões mutadas de sequências de linha germinativa humana ou anticorpo contendo sequências de estrutura de consenso derivadas de análises de sequências de estrutura humana, por exemplo, como descrito em Knappik, e outros (2000. J Mol Biol 296, 57-86).

[00026] Estas estruturas e locais de domínios variáveis de imunoglobulina, por exemplo, CDRs, podem ser definidas usando esquemas de numeração bem conhecidos, por exemplo, o esquema de numeração de Kabat, o esquema de numeração de Chothia, uma combinação de Kabat e Chothia (AbM), etc. (vide, por exemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat e outros; Al Lazikani e outros (1997) J. Mol. Bio. 273:927 948).

[00027] Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências humanas (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese de sítio específico ou aleatória *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo "anticorpo humano", como usado aqui, não é pretendido incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies de mamífero, tais como um camundongo, foram enxertadas em sequências de estrutura humanas.

[00028] O termo "anticorpo humano monoclonal" refere-se aos anticorpos que exibem uma única especificidade de ligação que tem regiões variáveis nas quais ambas as regiões de estrutura e CDR são derivadas de sequências humanas. Em uma modalidade, os anticorpos humanos monoclonais são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia longa humana e um transgene de cadeia curta fundido a uma célula imortalizada.

[00029] O termo "anticorpo humano recombinante", como usado aqui, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado dele, anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, de um transfectoma, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humano recombinante, combinatório, e anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a divisão de todo ou uma porção de uma sequência de gene de imunoglobulina humano, para outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis nas quais as

regiões de estrutura e CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana. Em certas modalidades, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humanas é usado, mutagênese somática *in vivo*) e desse modo as sequências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, ao mesmo tempo em que derivadas de e relacionadas com as sequências de V_H e V_L de linha germinativa humana, não podem naturalmente existir no repertório de linha germinativa de anticorpo humano *in vivo*.

[00030] Como usado aqui, "isótipo" refere-se a uma classe de anticorpo (por exemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 ou IgG2) que é fornecida pelos genes de região constante de cadeia longa.

[00031] As frases "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usados alternadamente com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno".

[00032] Como usado aqui, um anticorpo que "especificamente se liga ao polipeptídeo de BAFFR" é pretendido referir-se a um anticorpo que se liga ao polipeptídeo de BAFFR humano com um K_D de 100nM ou menos, 10nM ou menos, 1nM ou menos. Um anticorpo que "reage cruzado com um antígeno exceto BAFFR" é pretendido referir-se a um anticorpo que liga aquele antígeno com um K_D de 0,5 x 10⁻⁸ M ou menos, 5 x 10⁻⁹ M ou menos, ou 2 x 10⁻⁹ M ou menos. Um anticorpo que "não reage cruzado com um antígeno particular" é pretendido referir-se a um anticorpo que se liga àquele antígeno, com um K_D de 1,5 x 10⁻⁸ M ou maior, ou um K_D de 5-10 x 10⁻⁸ M ou 1 x 10⁻⁷ M ou maior. Em certas modalidades, tais anticorpos que não reagem cruzado com o antígeno exibem ligação essencialmente indetectável contra estas proteínas em ensaios de ligação padrão.

[00033] Como usado aqui, o termo "anticorpo antagonista" é

pretendido referir-se a um anticorpo que reduz, diminui e/ou inibe a atividade de sinalização induzida por BAFFR na presença de BLyS em um ensaio de célula B humana tal como o ensaio de proliferação de célula B humana ou ensaio de Produção de IgG1 de célula B humana. Os exemplos de ensaio de proliferação de célula B humana e ensaio de produção de IgG1 são descritos em maiores detalhes nos exemplos abaixo. Em algumas modalidades, os anticorpos reduzem, diminuem ou inibem a atividade induzida por BLyS como medido em um ensaio de proliferação de célula B humana em um IC₅₀ de 10nM ou menos, 1nM ou menos, ou 100pM ou menos. Em algumas modalidades, os anticorpos inibem a atividade induzida por BLyS como medido em um ensaio de produção de IgG1 em um IC₅₀ de 10nM ou menos, 1nM ou menos, ou 100pM ou menos.

[00034] Como usado aqui, um anticorpo com "nenhuma atividade agonística" é pretendido referir-se a um anticorpo que não significativamente aumenta a atividade de sinalização mediada por BAFFR na ausência de BLyS em um ensaio com base em célula, tal como o ensaio de proliferação de célula B humana. Tais ensaios são descritos em maiores detalhes nos exemplos abaixo.

[00035] Como usado aqui, um anticorpo que depaupera as células B *in vitro* é pretendido referir-se a um anticorpo que depaupera as células B com um EC₅₀ de 10nM ou menos, preferivelmente com um EC₅₀ de 1nM ou menos, mais preferivelmente com um EC₅₀ de 100pM, ou menos, como medido em um ensaio de depleção de célula B humana (ADCC). Tais ensaios são descritos em maiores detalhes nos exemplos abaixo.

[00036] Como usado aqui, um anticorpo que depaupera as células B *in vivo* é pretendido referir-se a um anticorpo que reduz *in vivo* a porcentagem de células B até 70%, preferivelmente 80% e mais preferivelmente 90%, como medido por classificação de célula ativada

por fluorescência (FACS) de células B. Tais ensaios são descritos em maiores detalhes nos exemplos abaixo.

[00037] O termo " K_{assoc} " ou " K_a ", como usado aqui, é pretendido referir-se à taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, considerando que o termo " K_{dis} " ou " K_d ," como usado aqui, é pretendido referir-se a taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. O termo " K_D ", como usado aqui, é pretendido referir-se a constante de dissociação, que é obtida da relação de K_d para K_a (isto é K_d/K_a) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores de K_D para os anticorpos podem ser determinados usando os métodos bem estabelecidos na técnica. Um método para determinar o K_D de um anticorpo é pelo uso da ressonância de plasmônio superficial, ou pelo uso de sistema biossensor tal como um sistema de Biacore®.

[00038] Como usado aqui, o termo "Afinidade" refere-se a resistência da interação entre o anticorpo e o antígeno em sítios antigênicos únicos. Em cada sítio antigênico, a região variável da "ramificação" de anticorpo interage através das forças não covalentes fracas com antígenos em numerosos sítios; quanto mais interações, mais forte a afinidade.

[00039] Como usado aqui, o termo "Avidez" refere-se a uma medição informativa da estabilidade total ou força de um complexo de anticorpo-antígeno. É controlado por três fatores principais: afinidade de epítipo de anticorpo; a valência de ambos o antígeno e o anticorpo; e a disposição estrutural das partes de interação. Finalmente estes fatores definem a especificidade do anticorpo, isto é, a probabilidade do anticorpo particular está se ligando a um epítipo de antígeno preciso.

[00040] Como usado aqui, o termo atividade de "ADCC" ou "citotoxicidade celular dependente de anticorpo" refere-se a atividade de depleção de célula B humana. A atividade de ADCC pode ser medida pelos ensaios de depleção de célula B humana descritos acima.

[00041] Para obter uma sonda de avidéz superior, um conjugado dimérico (duas moléculas de uma proteína de anticorpo acoplada a um marcador de FACS) pode ser construído, desse modo preparando interações de baixa afinidade (tais como com o anticorpo de linha germinativa) mais facilmente detectadas por FACS. Além disso, outros meios de aumentar a avidéz de ligação de antígeno envolvem gerar dímeros, trímeros ou multímeros de quaisquer das construções descritas aqui dos anticorpos anti-BAFFR. Tais multímeros podem ser gerados através de ligação covalente entre módulos individuais, por exemplo, imitando-se a ligação de terminal de C a N natural ou imitando-se os dímeros de anticorpo que são mantidos juntos através de suas regiões constantes. As ligações construídas na interface de Fc/Fc podem ser covalentes ou não covalentes. Além disso, os pares de dimerização ou multimerização exceto Fc podem ser usados em híbridos de BAFFR para criar tais estruturas de ordem superior. Por exemplo, é possível usar domínios de multimerização tal como domínios de trimerização descritos em Borean (WO2004039841) ou domínio de pentamerização descrito no pedido de patente publicado WO98/18943.

[00042] Como usado aqui, o termo "seletividade" para um anticorpo refere-se a um anticorpo que se liga a um certo polipeptídeo alvo porém não polipeptídeo estritamente relacionados.

[00043] Como usado aqui, o termo "afinidade elevada" para um anticorpo refere-se a um anticorpo tendo um K_D de 1 nM ou menos para um antígeno-alvo. Como usado aqui, o termo "paciente" inclui qualquer animal humano ou não humano.

[00044] O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

[00045] Como usado aqui, o termo, "ideal" significa que uma

sequência de nucleotídeo foi alterada para codificar uma sequência de aminoácido usando códons que são preferidos na produção de célula ou organismo, geralmente uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de *Pichia*, uma célula de *Trichoderma*, uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou uma célula humana. A sequência de nucleotídeo ideal é construída para reter completamente ou tanto quanto possível a sequência de aminoácido originalmente codificada pela sequência de nucleotídeo de partida, que é também conhecida como a sequência "parental". As sequências ideais aqui foram construídas para ter códons que são preferidos em células de mamífero de CHO; entretanto a expressão ideal destas sequências em outras células eucarióticas é também considerada aqui. As sequências de aminoácido codificadas por sequências de nucleotídeo ideais são também referidas como ideais.

[00046] Vários aspectos da invenção são descritos em detalhes adicionais nas seguintes subseções.

[00047] Os ensaios padrões para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos para BAFFR de várias espécies são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ELISAs, manchas do oeste e RIAs. Os ensaios adequados são descritos nos Exemplos. Os cinéticos de ligação (por exemplo, afinidade de ligação) dos anticorpos também podem ser avaliados por ensaios padrões conhecidos na técnica, tal como por análise de Biacore. Os ensaios para avaliar os efeitos dos anticorpos em propriedades funcionais de BAFFR (por exemplo, ligação de receptor, prevenção ou indução de proliferação de célula B humana ou produção de IgG) são descritos em detalhes adicionais nos exemplos.

[00048] Consequentemente, um anticorpo que "inibe" uma ou mais destas propriedades funcionais de BAFFR (por exemplo, atividade bioquímica, imunoquímica, celular, fisiológica ou outras atividades

biológicas, ou similares) como determinado de acordo com as metodologias conhecidas pela técnica e descritas aqui, será entendido referir-se a uma diminuição estatisticamente significativa na atividade particular relativo àquela vista na ausência do anticorpo (por exemplo, ou quando um anticorpo de controle de especificidade irrelevante está presente). Um anticorpo que inibe os efeitos da atividade de BAFFR realiza tal diminuição estatisticamente significativa em pelo menos 10% do parâmetro medido, em pelo menos 50%, 80% ou 90%, e em certas modalidades um anticorpo da invenção pode inibir mais do que 95%, 98% ou 99% de atividade funcional de BAFFR.

[00049] Os termos "bloqueio cruzado", e "bloqueado cruzado" são usados alternadamente aqui para significar a capacidade de um anticorpo ou outro agente de ligação de interferir com a ligação de outros anticorpos ou agentes de ligação para BAFFR em um ensaio de ligação competitivo padrão.

[00050] A capacidade ou extensão a qual um anticorpo ou outro agente de ligação é capaz de interferir com a ligação de outro anticorpo ou molécula de ligação a BAFFR, e, portanto se pode ser dito bloqueio cruzado de acordo com a invenção, pode ser determinada usando ensaios de ligação de competição padrões. Um ensaio adequado envolve o uso da tecnologia de Biacore (por exemplo, usando-se o instrumento de BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suécia)), que pode medir a extensão de interações usando tecnologia de ressonância de plasmônio superficial. Outro ensaio para medir o bloqueio cruzado usa uma abordagem com base em ELISA.

[00051] Outros detalhes em ambos os métodos são dados nos Exemplos.

[00052] De acordo com a invenção, um anticorpo de bloqueio cruzado ou outro agente de ligação de acordo com a invenção se liga a BAFFR no ensaio de bloqueio cruzado de BIAcore descrito tal que a

ligação registrada da combinação (mistura) dos anticorpos ou agentes de ligação seja entre 80% e 0,1% (por exemplo 80% a 4%) da ligação teórica máxima, especificamente entre 75% e 0,1% (por exemplo 75% a 4%) da ligação teórica máxima, e mais especificamente entre 70% e 0,1% (por exemplo, 70% a 4%), e mais especificamente entre 65% e 0,1% (por exemplo, 65% a 4%) de ligação teórica máxima (como definido acima) dos dois anticorpos ou agentes de ligação em combinação.

[00053] Um anticorpo é definido como o bloqueio cruzado no ensaio de ELISA como descrito nos exemplos, se o anticorpo anti-BAFFR de fase de solução é capaz de causar uma redução dentre 60% e 100%, especificamente entre 70% e 100%, e mais especificamente entre 80% e 100%, do sinal de detecção de BAFFR (isto é, a quantidade de BAFFR ligado pelo anticorpo revestido) quando comparado com o sinal de detecção de BAFFR obtido na ausência do anticorpo anti-BAFFR de fase de solução (isto é, as cavidades de controle positivo).

Anticorpos Recombinantes

[00054] Os anticorpos da invenção incluem os anticorpos recombinantes humanos, isolados e estruturalmente caracterizados como descrito, nos exemplos. As sequências de aminoácido de V_H de anticorpos isolados da invenção são mostradas na SEQ ID NOs: 50-56. As sequências de aminoácido de V_L de anticorpo isolados da invenção são mostradas em SEQ ID NOs: 43-49 respectivamente. Os exemplos de sequências de aminoácido de cadeia curta de tamanho natural preferidas de anticorpos da invenção são mostrados na SEQ ID NO:71-74. Os exemplos de sequências de aminoácido de cadeia longa de tamanho natural preferidas de anticorpos da invenção são mostradas na SEQ ID NO:75-78 respectivamente. Outros exemplos de sequências de aminoácido de cadeia curta e longa de tamanho natural preferidas de anticorpos são aquelas codificadas por sequências de DNA

correspondentes contidas em plasmídeos pBW510 e pBW512 como depositado por Novartis Pharma AG, Forum 1, CH-4002 Basel, Suíça, em DSMZ em 29 de abril de 2009 com número de acesso DSM22542 e DSM22543 respectivamente. Outros anticorpos da invenção incluem aminoácidos que foram mutados por deleção, inserção ou substituição de aminoácido, ainda tendo pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 por cento de identidade nas regiões de CDR com as regiões de CDR descritas nas sequências descritas acima, incluindo as regiões CDR codificadas por sequências de DNA correspondentes de plasmídeos pBW510 e pBW512 como descrito por Novartis Pharma AG, Forum 1, CH-4002 Basel, Suíça, em DSMZ em 29 de abril de 2009 com número de acesso DSM22542 e DSM22543 respectivamente. Em algumas modalidades, inclui sequências de aminoácido mutantes onde não mais do que 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos foram mutados por deleção, inserção ou substituição de aminoácido nas regiões de CDR quando comparadas com as regiões de CDR descritas na sequência descrita acima.

[00055] Além disso, as sequências de nucleotídeo parentais de cadeia longa variáveis são mostradas em SEQ ID NO 64. As sequências de nucleotídeo parentais de cadeia curta variáveis são mostradas em SEQ ID NO 57. Sequências de nucleotídeo de cadeia curta de tamanho natural ideais para a expressão em uma célula de mamífero são mostradas na SEQ ID NOs 83-86. Sequências de nucleotídeo de cadeia longa de tamanho natural ideais para a expressão em uma célula de mamífero são mostradas em SEQ ID NOs 79-82. Outros anticorpos da invenção incluem aminoácidos ou ácidos nucleicos que foram mutados, ainda tendo pelo menos 60, 70, 80, 90 ou 95 por cento de identidade com as sequências descritas acima. Em algumas modalidades, são incluídas sequências de aminoácido mutantes onde não mais do que 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos foram mutados por deleção, inserção ou substituição de aminoácido nas

regiões variáveis quando comparados com as regiões variáveis descritas nas sequências descritas acima.

[00056] Uma vez que cada destes anticorpos liga o mesmo epítopo e são progênies do mesmo anticorpo parental, as sequências V_H , V_L , de cadeia curta de tamanho natural, e cadeia longa de tamanho natural (sequência de nucleotídeos e sequências de aminoácido) podem ser "misturadas e combinadas" para criar outras moléculas de ligação anti-BAFFR da invenção. A ligação de BAFFR de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos acima e nos exemplos (por exemplo, ELISAs). Quando estas cadeias são misturadas e combinadas, uma sequência V_H de um pareamento de V_H/V_L particular deve ser substituído com uma sequência V_H estruturalmente similar. Da mesma forma uma sequência de cadeia longa de tamanho natural de um pareamento particular de cadeia longa de tamanho natural / cadeia curta de tamanho natural deve ser substituída com uma sequência de cadeia longa de tamanho natural estruturalmente similar. Da mesma forma, uma sequência V_L de um pareamento de V_H/V_L particular deve ser substituída com uma sequência V_L estruturalmente similar. Da mesma forma uma sequência de cadeia curta de tamanho natural de um pareamento particular de cadeia longa de tamanho natural / cadeia curta de tamanho natural deve ser substituída com uma sequência de cadeia curta de tamanho natural estruturalmente similar. Consequentemente, em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou região de ligação de antígeno do mesmo tendo: uma região variável de cadeia longa que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do que consiste em SEQ ID NOs: 50-56; e uma região variável de cadeia curta que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 43-49; onde o anticorpo especificamente se liga ao BAFFR.

[00057] Em outro aspecto, a invenção fornece

(i) um anticorpo recombinante isolado tendo: uma cadeia longa de tamanho natural que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:75-78; e uma cadeia curta de tamanho natural que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:71-74; onde o anticorpo especificamente se liga a BAFFR, ou

(ii) uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma.

[00058] Em outro aspecto, a invenção fornece

(i) um anticorpo recombinante isolado tendo: uma cadeia longa de tamanho natural codificada por uma sequência de nucleotídeo que foi otimizada para expressão na célula de um mamífero selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:79-82; e uma cadeia curta de tamanho natural codificada por uma sequência de nucleotídeo que foi otimizada para expressão na célula de um mamífero selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:83-86; em que o anticorpo especificamente se liga a BAFFR; ou,

(ii) uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma.

[00059] As sequências de aminoácido dos CDR1s de V_H dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 1-7. As sequências de aminoácido dos CDR2s de V_H dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 8-14. As sequências de aminoácido dos CDR3s de V_H dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 15-21. As sequências de aminoácido dos CDR1s de V_L dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 22-28. As sequências de aminoácido dos CDR2s de V_L dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 29-35. As sequências de aminoácido dos CDR3s de V_L dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 36-42. As regiões de CDR apresentadas na SEQ ID NOs:1-42

são delineadas usando o sistema de Kabat (Kabat, E. A., e outros, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242).

[00060] Determinado que cada um destes anticorpos pode se ligar a BAFFR e que a especificidade de ligação de antígeno é fornecida principalmente pelas regiões CDR1, 2 e 3, as sequências de CDR1, 2 e 3 de V_H e sequências de CDR1, 2 e 3 de V_L podem ser "misturadas e combinadas" (isto é, CDRs de anticorpos diferentes podem ser misturados e combinados, cada anticorpo contendo um CDR1, 2 e 3 de V_H e um CDR1, 2 e 3 de V_L cria outras moléculas de ligação anti-BAFFR da invenção. A ligação de BAFFR de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs). Quando as sequências CDR de V_H são misturadas e combinadas, as sequências de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência V_H particular deve ser substituída com uma sequência(s) CDR estruturalmente similar. Da mesma forma, quando sequências CDR de V_L são misturadas e combinadas, as sequências de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência de V_L particular deve ser substituída com uma sequência(s) de CDR estruturalmente similar. Será facilmente evidente para os técnicos ordinariamente versados que novas sequências de V_H e V_L podem ser criadas substituindo-se uma ou mais sequências da região de CDR de V_H e/ou V_L com sequências estruturalmente similares das sequências de CDR mostradas aqui para anticorpos monoclonais da presente invenção.

[00061] Em algumas modalidades, os anticorpos recombinantes isolados, ou região de ligação de antígenos dos mesmos têm: um CDR1 de região variável de cadeia longa que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1-7;

um CDR2 de região variável de cadeia longa que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8-14; um CDR3 de região variável de cadeia longa que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15-21; um CDR1 de região variável de cadeia curta que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-28; um CDR2 de região variável de cadeia curta que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29-35; e um CDR3 de região variável de cadeia curta que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 36-42; onde o anticorpo especificamente liga BAFFR.

[00062] Em uma certa modalidade, o anticorpo compreende: um CDR1 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 2; um CDR2 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 9; um CDR3 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 16; um CDR1 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 23; um CDR2 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 30; e um CDR3 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 37.

[00063] Em uma certa modalidade, o anticorpo compreende: um CDR1 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 3; um CDR2 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 10; um CDR3 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 17; um CDR1 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 24; um CDR2 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 31; e um CDR3 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 38.

[00064] Em uma certa modalidade, o anticorpo compreende: um CDR1 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 4; um CDR2 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 11; um CDR3 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 18; um CDR1 de região

variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 25; um CDR2 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 32; e um CDR3 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 39.

[00065] Em uma certa modalidade, o anticorpo compreende: um CDR1 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 5; a um CDR2 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 12; um CDR3 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 19; um CDR1 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 26; um CDR2 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 33; e um CDR3 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 40.

[00066] Em uma certa modalidade, o anticorpo compreende: um CDR1 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 6; a um CDR2 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 13; um CDR3 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 20; um CDR1 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 27; um CDR2 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 34; e um CDR3 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 41.

[00067] Em uma certa modalidade, o anticorpo compreende: um CDR1 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 7; a um CDR2 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 14; um CDR3 de região variável de cadeia longa de SEQ ID NO: 21; um CDR1 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 28; um CDR2 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 35; e um CDR3 de região variável de cadeia curta de SEQ ID NO: 42.

[00068] Como usado aqui, um anticorpo humano compreende região variável de cadeia curta ou longa ou cadeia curta ou longa de tamanho natural que são "o produto de" ou "derivada de" uma sequência de linha germinativa particular se as regiões variáveis ou cadeias de tamanho natural do anticorpo são obtidas de um sistema que usa genes de imunoglobulina de linha germinativa humana. Tais sistemas incluem a

imunização de um camundongo transgênico carregando os genes de imunoglobulina com o antígeno de interesse ou avaliando-se uma biblioteca de gene de imunoglobulina humana exibida em fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência imunoglobulina de linha germinativa humana pode ser identificado como tal comparando-se a sequência de aminoácido do anticorpo humano com as sequências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinativa humana e selecionando-se a sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana que está mais próxima na sequência (isto é, maior % de identidade) com a sequência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência particular de imunoglobulina de linha germinativa humana pode conter diferenças de aminoácido quando comparada com a sequência de linha germinativa, devido a, por exemplo, mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação direcionada ao sítio. Entretanto, um anticorpo humano selecionado tipicamente é pelo menos 90% idêntico em sequência de aminoácido a uma sequência de aminoácido codificada por um gene de imunoglobulina de linha germinativa humana e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as sequências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinativa de outras espécies (por exemplo, sequências de linha germinativa de murino). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, ou pelo menos 95%, ou mesmo pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntico na sequência de aminoácido à sequência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinativa. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma sequência de linha germinativa humana particular exibirá não mais do que 10 diferenças de aminoácido da sequência de aminoácido codificada pelo gene de

imunoglobulina de linha germinativa humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode exibir não mais do que 5, ou ainda não mais do que 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácido da sequência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinativa.

Anticorpos Homólogos

[00069] Em ainda outra modalidade, um anticorpo da invenção tem sequências de aminoácido de cadeia curta e longa de tamanho natural; sequência de nucleotídeos de cadeia curta e longa de tamanho natural, sequência de nucleotídeos de cadeia curta ou longa de região variável, ou sequências de aminoácido de cadeia curta e longa de região variável que são homólogas a sequência de aminoácido e nucleotídeos dos anticorpos descritos aqui, e onde os anticorpos retêm as propriedades funcionais dos anticorpos anti-BAFFR da invenção.

[00070] Por exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado (ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma) que compreende uma região variável de cadeia longa e uma região variável de cadeia curta, onde: a região variável de cadeia longa compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou pelo menos 90% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 50-56; a região variável de cadeia curta compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou pelo menos 90% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 43-49; o anticorpo especificamente se liga a BAFFR, e o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades funcionais: inibe a proliferação de célula B induzida por BLyS, ou Produção de IgG1 induzida por BLyS e depaupera a célula B *in vitro* ou *in vivo*.

[00071] Em um outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, (ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma) que compreende uma cadeia

longa de tamanho natural e uma cadeia curta de tamanho natural, onde: a cadeia longa de tamanho natural compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou pelo menos 90% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 75-78; a cadeia curta de tamanho natural compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou pelo menos 90% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 71-74; o anticorpo especificamente se liga a BAFFR, e o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades funcionais: inibe a proliferação de célula B induzida por BLyS, ou produção de IgG1 induzida por BLyS e depaupera célula B *in vitro* ou *in vivo*.

[00072] Em outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado (ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma), que compreende uma cadeia longa de tamanho natural e uma cadeia curta de tamanho natural, em que: a cadeia longa de tamanho natural é codificada por uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80%, ou pelo menos 90% idêntica a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 79-82; a cadeia curta de tamanho natural é codificada por uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80%, ou pelo menos 90% idêntica a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 83-86; o anticorpo especificamente se liga a BAFFR, e o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades funcionais: inibe a proliferação de célula B induzida por BLyS, ou produção de IgG1 induzida por BLyS e depaupera célula B *in vitro* ou *in vivo*.

[00073] Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três das propriedades funcionais descritas acima. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um

anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico. Preferivelmente o anticorpo é um anticorpo de IgG1 completamente humano.

[00074] Em outras modalidades, as sequências de aminoácido de V_H e/ou V_L podem ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências apresentadas acima. Em outras modalidades, as sequências de aminoácido de V_H e/ou V_L podem ser idênticas exceto uma substituição de aminoácido em não mais do que 1, 2, 3, 4 ou 5 posições de aminoácido. Um anticorpo tendo as regiões V_H e V_L tendo identidade elevada (isto é, 80% ou maior) com as regiões de V_H e V_L de SEQ ID NOs 50-56 e SEQ ID NOs 43-49 respectivamente, pode ser obtido por mutagênese (por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico codificando a SEQ ID NOs: 64-70 e 57-63 respectivamente, seguido por teste do anticorpo alterado codificado para função retida (isto é, as funções apresentadas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

[00075] Em outras modalidades, as sequências de aminoácido de cadeia longa de tamanho natural e/ou cadeia curta de tamanho natural podem ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências apresentadas acima. Um anticorpo tendo uma cadeia longa de tamanho natural e cadeia curta de tamanho natural tendo identidade elevada (isto é, 80% ou maior) com a cadeia longa de tamanho natural de quaisquer das SEQ ID NOs 75-78 e cadeia curta de tamanho natural de quaisquer das SEQ ID NOs 71-74 respectivamente, pode ser obtido por mutagênese (por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico codificando SEQ ID NOs 79-82 e SEQ ID NOs 83-86 respectivamente, seguido por teste do anticorpo alterado codificado para a função retida (isto é, as funções apresentadas acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

[00076] Em outras modalidades, as sequências de nucleotídeo de cadeia longa de tamanho natural e/ou cadeia curta de tamanho natural podem ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências apresentadas acima.

[00077] Em outras modalidades, as sequência de nucleotídeos de regiões variáveis de cadeia longa e/ou cadeia curta podem ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências apresentadas acima

[00078] Como usado aqui, o percentual de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de identidade = Número de posições idênticas /Número total de posições x 100), levando em consideração o número de entradas, e o comprimento de cada entrada, que necessita ser introduzida para alinhamento ideal das duas sequências. A comparação das sequências e determinação do percentual de identidade entre as duas sequências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático, como descrito abaixo.

[00079] O percentual de identidade entre duas sequências de aminoácido pode ser determinado usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de extensão de espaço vazio de 12 e uma penalidade de espaço vazio de 4. Além disso, o percentual de identidade entre as duas sequências de aminoácido pode ser determinado usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando uma matriz Blossom 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de espaço vazio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

Anticorpos com modificações conservativas

[00080] Em certas modalidades, um anticorpo da invenção tem uma região variável de cadeia longa que compreende as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 e uma região variável de cadeia curta que compreende sequências de CDR1, CDR2, e CDR3, em que uma ou mais destas sequências de CDR têm sequências especificadas de aminoácido com base nos anticorpos descritos aqui ou modificações conservativas das mesmas, e onde os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-BAFFR da invenção. Consequentemente, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado, ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma, consistindo em uma região variável de cadeia longa que compreende as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 e uma região variável de cadeia curta que compreende as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3, onde: as regiões variáveis de cadeia longa de sequências de aminoácido de CDR1 são selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs:1-7, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões variáveis de cadeia longa de sequências de aminoácido de CDR2 são selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8-14, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões variáveis de cadeia longa de sequências de aminoácido de CDR3 são selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15-21, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões variáveis de cadeia curta de sequências de aminoácido de CDR1 são selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-28, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões variáveis de cadeia curta de sequências de aminoácido de CDR2 são selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29-35, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões variáveis de cadeia curta de sequências de aminoácido CDR3 são selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 36-42, e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo

especificamente se liga a BAFFR, e o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades funcionais: inibe a proliferação de célula B induzida por BLyS, ou produção de IgG1 induzida por BLyS e depaupera as células B *in vitro* ou *in vivo*.

[00081] Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais listadas descritas acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

[00082] Em outras modalidades, um anticorpo da invenção otimizado para a expressão em uma célula de mamífero tem uma sequência de cadeia longa de tamanho natural e uma sequência de cadeia curta de tamanho natural, onde uma ou mais destas sequências tem sequências de aminoácido específicas com base nos anticorpos descritos aqui ou modificações conservadoras das mesmas, e onde os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas do anticorpo anti-BAFFRs da invenção. Consequentemente, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado otimizado para expressão em uma célula de mamífero consistindo em uma cadeia longa de tamanho natural e uma cadeia curta de tamanho natural onde: a cadeia longa de tamanho natural tem sequências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 75-78, e modificações conservadoras das mesmas; e a cadeia curta de tamanho natural tem sequências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 71-74, e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente se liga a BAFFR; e o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades funcionais: inibe a proliferação de célula B induzida por BLyS, ou produção de IgG1 induzida por BLyS e depaupera célula B *in vitro* ou *in vivo*.

[00083] Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir um ou mais, dois ou mais ou três ou mais das propriedades funcionais listadas

descritas acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

[00084] Como usado aqui, o termo "modificações de sequência conservadora" é pretendido referir-se às modificações de aminoácido que não significantemente afetam ou alteram as características de ligação do anticorpo contendo a sequência de aminoácido. Tais modificações conservadoras incluem substituições, adições e deleções de aminoácido. As modificações podem ser introduzidas em um anticorpo da invenção por técnicas padrões conhecidas na técnica, tal como mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR.

[00085] As substituições de aminoácido conservadoras aquelas nas quais o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Desse modo, um ou mais resíduos de aminoácido nas regiões de CDR de um anticorpo da invenção podem ser substituídos com outros resíduos de aminoácido da mesma família de cadeia lateral, e o anticorpo alterado pode ser testado quanto à função retida usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Anticorpos que se ligam ao mesmo epítipo como os anticorpos anti-BAFFR da invenção

[00086] Em outra modalidade, a invenção fornece anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo como dos vários anticorpos anti-BAFFR específicos da invenção descrita aqui. Todos os anticorpos descritos nos Exemplos que são capazes de bloquear o efeito induzido por BLyS ligam o mesmo epítopo em BAFFR com afinidade elevada, o referido epítopo estando compreendido entre os aminoácidos de SEQ ID NO:88.

[00087] Anticorpos adicionais podem, portanto ser identificados com base em sua capacidade de competir cruzado (por exemplo, competitivamente inibir a ligação de, de uma maneira estatisticamente significativa) com outros anticorpos da invenção nos ensaios de ligação de BAFFR padrões. A capacidade de um anticorpo de teste inibir a ligação dos anticorpos da presente invenção ao BAFFR humano demonstra que o composto de teste pode competir com aquele anticorpo para ligar ao BAFFR humano; um tal anticorpo pode, de acordo com a teoria não limitante, se ligar ao mesmo ou um epítopo relacionado (por exemplo, um estruturalmente similar ou espacialmente próximo) epítopo em BAFFR humano como o anticorpo com o qual ele compete. Desse modo, outro aspecto da invenção fornece anticorpos que se ligam ao mesmo antígeno como, e competem com, os anticorpos descritos aqui por sequência. Em uma certa modalidade, o anticorpo que se liga ao mesmo epítopo em BAFFR humano como os anticorpos da presente invenção é um anticorpo recombinante humano. Tais anticorpos recombinantes humanos podem ser preparados e isolados como descrito nos exemplos.

Anticorpos construídos e modificados

[00088] Um anticorpo da invenção também pode ser preparado usando um anticorpo tendo uma ou mais das sequências de V_H e/ou V_L mostradas aqui como material de partida para construir um anticorpo modificado, cujo anticorpo modificado pode ter propriedades alteradas do anticorpo inicial. Um anticorpo pode ser construído modificando-se

um ou mais resíduos em uma ou ambas as regiões variáveis (isto é, V_H e/ou V_L), por exemplo, em uma ou mais regiões de CDR e/ou em uma ou mais regiões de estrutura. Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser construído modificando-se os resíduos nas regiões constantes, por exemplo, para alterar a função efetora do anticorpo.

[00089] Um tipo de construção de região variável que pode ser realizada é a enxertia de CDR. Os anticorpos interagem com os antígenos alvos predominantemente através de resíduos de aminoácido que estão localizados nas seis regiões de determinação de complementariedade (CDRs) de cadeia curta e longa. Por esta razão, as sequências de aminoácido em CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que as sequências do lado de fora dos CDRs. Por que as Sequências de CDR são responsáveis pela maioria das interações de anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitam as propriedades de anticorpos de ocorrência natural específicos construindo-se vetores de expressão que incluem sequências de CDR do anticorpo de ocorrência natural específico enxertado em sequências de estrutura de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann, L. e outros, 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. e outros, 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. e outros, 1989 Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86:10029-10033; Patente dos U.S. No. 5.225.539 de winter, e Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 por Queen e outros)

[00090] Consequentemente, outra modalidade da invenção pertence a um anticorpo monoclonal anti-BAFFR isolado, ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno da mesma, que compreende uma região variável de cadeia longa que compreende sequências de CDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1-7; sequências de

CDR2 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8-14; sequências de CDR3 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15-21, respectivamente; e uma região variável de cadeia curta tendo sequências de CDR1 tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-28; Sequência de CDR2s tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29-35; e Sequência de CDR3s consistindo em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 36-42, respectivamente. Desse modo, tais anticorpos contêm as sequências de CDR de V_H e V_L de anticorpos monoclonais, ainda podem conter diferentes sequências de estrutura destes anticorpos.

[00091] Tais sequências de estrutura podem ser obtidas de banco de dados de DNA públicos ou referências publicadas que incluem sequências gene de anticorpo de linha germinativa. Por exemplo, as sequências de DNA de linha germinativa para genes de região variável de cadeia curta e longa humanos podem ser encontrados no banco de dados de sequência de linha germinativa humana "VBase" (disponível na Internet em www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), como também em Kabat, E. A., e outros, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., e outros, 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox, J. P. L. e outros, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836.

[00092] Um exemplo de sequências de estrutura para uso nos anticorpos da invenção são aquelas que são estruturalmente similares às sequências de estrutura usadas por anticorpos da invenção selecionados, por exemplo, sequências de consenso e/ou sequências de estrutura usadas por anticorpos monoclonais da invenção. As

sequências de CDR1, 2 e 3 de V_H , e as sequências de CDR1, 2 e 3 de V_L podem ser enxertadas em regiões de estrutura que têm as sequências idênticas como aquelas encontradas no gene de imunoglobulina de linha germinativa do qual a sequência de estrutura deriva, ou as sequências de CDR podem ser enxertadas em regiões de estrutura que contêm uma ou mais mutações quando comparadas com as sequências de linha germinativa. Por exemplo, descobriu-se que em certos casos é benéfico modificar os resíduos nas regiões de estrutura para manter ou realçar a capacidade de ligação de antígeno do anticorpo (vide por exemplo, Patente dos U.S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 por Queen e outros).

[00093] Outro tipo de modificação de região variável é modificar os resíduos de aminoácido nas regiões de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de V_H e/ou V_L para desse modo melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse, conhecido como "maturação por afinidade". A Mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a mutação(s) e o efeito na ligação de anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliada em ensaios *in vitro* ou *in vivo* como descrito aqui e fornecido nos Exemplos. As modificações conservadoras (como descrito acima) podem ser introduzidas. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácido. Além disso, tipicamente não mais do que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos em uma região de CDR são alterados.

[00094] Consequentemente, em outra modalidade, a invenção fornece anticorpos monoclonais anti-BAFFR isolados, ou uma proteína funcional que compreende uma porção de ligação de antígeno dos mesmos, consistindo em uma região variável de cadeia longa tendo: uma região de CDR de V_H consistindo em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo tendo SEQ ID NOs: 1-7 ou uma

sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, adições ou deleções de aminoácido quando comparada com SEQ ID NOs: 1-7; uma região de CDR2 de V_H tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8-14, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, adições ou deleções de aminoácido quando comparada com SEQ ID NOs: 8-14; uma região de CDR3 de V_H tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15-21, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, adições ou deleções de aminoácido quando comparada com SEQ ID NOs: 15-21; uma região de CDR1 de V_L tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-28, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, adições ou deleções de aminoácido quando comparada com SEQ ID NOs: 22-28; uma região de CDR2 de V_L tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29-35, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, adições ou deleções de aminoácido quando comparada com SEQ ID NOs: 29-35; e uma região de CDR3 de V_L tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 36-42, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, adições ou deleções de aminoácido quando comparada com SEQ ID NOs: 36-42.

Enxertia de domínios de ligação de antígeno em andaimes ou estruturas alternativas

[00095] Uma ampla variedade de estruturas ou andaimes de anticorpo/imunoglobulina pode ser empregada contanto que os polipeptídeos resultantes incluam pelo menos uma região de ligação que especificamente se liga a BAFFR. Tais estruturas e andaimes

incluem os 5 principais idiótipos de imunoglobulinas humanas, ou fragmentos das mesmas (tais como aquelas descritas em outro lugar aqui), e incluem imunoglobulinas de outras espécies animais, preferivelmente tendo aspectos humanizados. Os anticorpos de cadeia longa única tais como aqueles identificados em camelídeos são de interesse particular neste respeito. Novas estruturas, andaimes e fragmentos continuam a ser descobertos e desenvolvidos por aqueles versados na técnica.

[00096] Em um aspecto, a invenção pertence à geração de anticorpos com base em não imunoglobulina usando andaimes de não imunoglobulina sobre os quais os CDRs da invenção podem ser enxertados. As estruturas ou andaimes de não imunoglobulina conhecidos ou futuros podem ser empregados, contanto que eles compreendam uma região de ligação específica para a proteína-alvo de SEQ ID NO: 87. Tais compostos são conhecidos aqui como "polipeptídeos que compreendem uma região de ligação de alvo específico". Os exemplos de estrutura de não imunoglobulina são também descritos nas seções abaixo (anticorpos de camelídeo e andaime de não anticorpo).

Anticorpos de camelídeo

[00097] As proteínas de anticorpo obtidas de membros da família do camelo e dromedário (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromaderius*) incluindo novos membros mundiais tais como espécies de lhama (*Lama paccos*, *Lama glama* e *Lama vicugna*) foram caracterizadas com respeito ao tamanho, complexidade estrutural, e antigenicidade para pacientes humanos. Certos anticorpos de IgG desta família de mamíferos como encontrados na natureza necessitam de cadeias curtas, e são desse modo estruturalmente distintos da estrutura quaternária de quatro cadeias típica tendo duas cadeia curtas e duas longas, para os anticorpos de outros animais. Vide PCT/EP93/02214

(WO 94/04678 publicado em 3 de março de 1994).

[00098] Uma região do anticorpo de camélídeo que é o domínio variável único pequeno identificado como V_{HH} pode ser obtido por construção genética para produzir uma proteína pequena tendo afinidade elevada para um alvo, resultando em uma proteína derivada de anticorpo de peso molecular baixo conhecida como um "nanocorpo de camélídeo". Vide, Patente US número 5.759.808 emitida em 2 de junho de 1998; vide também Stijlemans, B. e outros, 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. e outros, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. e outros 2003 Bioconjugado Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. e outros 2002 Int J Cancer 89: 456-62; e Lauwereys, M. e outros 1998 EMBO J 17: 3512-3520. As bibliotecas construídas de anticorpos de camélídeo e fragmentos de anticorpo estão comercialmente disponibilizadas, por exemplo, por Ablynx, Ghent, Belgium. Como com outros anticorpos de origem não humana, uma sequência de aminoácido de um anticorpo de camélídeo pode ser alterado recombinantemente para obter uma sequência que mais se assemelhe a uma sequência humana, isto é, o nanocorpo pode ser "humanizado". Desse modo a antigenicidade baixa natural de anticorpos de camélídeo para humanos pode ser também reduzida.

[00099] O nanocorpo de camélídeo tem um peso molecular de aproximadamente um décimo daquele de uma molécula de IgG humana e a proteína tem um diâmetro físico de somente alguns nanômetros. Uma consequência do tamanho pequeno é a capacidade de nanocorpos de camélídeo se ligarem aos sítios antigênicos que são funcionalmente invisíveis para proteínas de anticorpo maiores, isto é, nanocorpos de camélídeo são úteis como reagentes que detectam antígenos que são de outro modo crípticos usando técnicas imunológicas clássicas, e quando possível, agentes terapêuticos. Desse modo, ainda outra consequência do tamanho pequeno é que o

nanocorpo de camélídeo pode inibir como um resultado da ligação a um sítio específico em uma ranhura ou fenda estreita de uma proteína-alvo, e, portanto, pode ser útil em uma capacidade que mais se assemelha a função de um fármaco de peso molecular baixo clássico do que aquela de um anticorpo clássico.

[000100] O tamanho compacto e peso molecular baixo também resultam em nanocorpos de camélídeo sendo extremamente termoestáveis, estáveis ao pH extremo, a digestão proteolítica, e fracamente antigênico. Outra consequência é que os nanocorpos de camélídeo facilmente se movem do sistema circulatório em tecidos, e ainda cruzam a barreira hematoencefálica e podem tratar distúrbios que afetam o tecido nervoso. Os nanocorpos podem também facilitar o transporte de fármaco através da barreira hematoencefálica. Vide, Pedido de Patente US 20040161738 publicado em 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas com a baixa antigenicidade a humanos indicam maior potencial terapêutico. Além disso, estas moléculas podem ser completamente expressas em células procarióticas tais como *E. coli* e são expressas como proteínas de fusão com bacteriófago e são funcionais.

[000101] Consequentemente, uma característica da presente invenção é um anticorpo ou nanocorpo de camélídeo tendo afinidade elevada com BAFFR. Em certas modalidades aqui, o anticorpo ou nanocorpo de camélídeo é naturalmente produzido no animal camélídeo, isto é, é produzido pelo camélídeo em seguida a imunização com BAFFR ou um fragmento de peptídeo do mesmo, usando técnicas descritas aqui para outros anticorpos. Alternativamente, o nanocorpo de camélídeo anti-BAFFR é construído, isto é, produzido por seleção, por exemplo, de uma biblioteca de fago exibindo proteínas de nanocorpo de camélídeo apropriadamente mutagenizadas usando procedimentos de panículação com BAFFR como um alvo como

descrito nos exemplos aqui. Em uma modalidade, um anticorpo da descrição é camelizado, tendo uma estrutura de camelídeo e regiões de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de V_H como descrito aqui. Os nanocorpos construídos podem também ser customizados por engenharia genética para ter uma meia vida em um paciente recipiente de 45 minutos a duas semanas. Em uma modalidade específica, o anticorpo ou nanocorpo de camelídeo é obtido por enxertia das sequências de CDRs da cadeia curta ou longa dos anticorpos humanos da invenção nas sequências de estrutura de anticorpo de domínio único ou nanocorpo, como descrito, por exemplo, em PCT/EP93/02214.

Andaime de não anticorpo

[000102] As estruturas ou andaimes de não imunoglobulina conhecidos incluem, porém não estão limitados a, Adnectins (fibronectina) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ancirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suíça), anticorpos de domínio (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) e Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalina) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemanha), imunofarmacêuticos modulares pequenos (Trubion Farmacêuticos Inc., Seattle, WA), maxicorpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Suécia) e afilina (gama-cristalina ou ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemanha), miméticos de epítipo de proteína (Polyphor Ltd, Allschwil, Suíça).

(i) Andaime de fibronectina

[000103] Os andaimes de fibronectina são com base preferivelmente em domínio de fibronectina tipo III (por exemplo, o décimo módulo da fibronectina tipo III (10 Fn3 domínio)). Um domínio de fibronectina tipo III tem 7 ou 8 cepas beta que são distribuídas entre duas folhas beta, que sozinhas embalam contra cada outra para formar o núcleo da proteína, e também contendo alças (análogas aos CDRs) que conectam as cepas beta a cada outra e são expostas ao solvente. Há pelo menos

três tais alças em cada borda do sanduíche de folha beta, onde a borda é o limiar da proteína perpendicular à direção das folhas beta (US 6.818.418).

[000104] Estes andaimes com base em fibronectina não são uma imunoglobulina, embora a dobra total esteja estritamente relacionada com aquela do fragmento de anticorpo funcional menor, a região variável da cadeia longa, que compreende a unidade de reconhecimento de antígeno total em IgG de camelo e lhama. Por causa desta estrutura, o anticorpo de não imunoglobulina imita as propriedades de ligação de antígeno que são similares em natureza e afinidade àqueles de anticorpos. Estes andaimes podem ser usados em uma estratégia de embaralhamento e randomização de alça *in vitro* que é similar ao processo de maturação por afinidade de anticorpos *in vivo*. Estas moléculas com base em fibronectina podem ser usadas como andaimes onde as regiões de alça da molécula podem ser substituídas com CDRs da invenção usando técnicas de clonagem padrões.

(ii) Ancirina – Pares Moleculares A tecnologia é com base no uso de proteínas com módulos de repetição derivados de ancirina como andaimes para as regiões variáveis de transporte que podem ser usadas para se ligar a diferentes alvos. O módulo de repetição de ancirina é um polipeptídeo de 33 aminoácidos consistindo em duas α -hélices antiparalelas e uma β -curva. A ligação das regiões variáveis é a maior parte das vezes otimizada pelo uso de exibição de ribossoma.

(iii) Maxicorpos/Avímeros - Avidia

[000105] Avímeros são derivados de proteína contendo o domínio A natural tal como LRP-1. Estes domínios são usados por natureza para interações de proteína-proteína e em mais de 250 proteínas humanas são estruturalmente com base nos domínios A. Os avímeros consistem em vários monômeros de "domínio A" diferentes (2-10) ligados através

dos ligadores de aminoácido. Os avímeros podem ser criados os quais possam se ligar ao antígeno-alvo usando a metodologia descrita em, por exemplo, 20040175756; 20050053973; 20050048512; e 20060008844.

(vi) Proteína A – Affibody

[000106] Os ligantes de afinidade de Affibody® são proteínas simples pequenas compostas de um feixe de três hélices com base no andaime de um dos domínios de ligação de IgG da Proteína A. A proteína A é uma proteína de superfície da bactéria *Staphylococcus aureus*. Este domínio de andaime consiste em 58 aminoácidos, 13 dos quais são randomizados para gerar bibliotecas de Affibody® com um número grande de variantes de ligante (videm, por exemplo, US 5.831.012). As moléculas de Affibody® imitam os anticorpos, elas têm um peso molecular de 6 kDa, comparado com o peso molecular de anticorpos, que é 150 kDa. Apesar de seu tamanho pequeno, o sítio de ligação de moléculas de Affibody® é similar àquele de um anticorpo.

(v) Anticalins – Pieris

[000107] Anticalins® são produtos desenvolvidos pela companhia Pieris ProteoLab AG. TEles são derivados de lipocalinas, um grupo muito difundido de proteínas pequenas e robustas que estão geralmente envolvidas no armazenamento e transporte fisiológico de compostos insolúveis ou quimicamente sensíveis. Várias lipocalinas naturais ocorrem em tecidos humanos ou líquidos corpóreos.

[000108] A arquitetura da proteína é remanescente de imunoglobulinas, com alças hipervariáveis no topo de uma estrutura rígida. Entretanto, em contraste com os anticorpos ou seus fragmentos recombinantes, as lipocalinas são compostas de uma única cadeia de polipeptídeo com 160 a 180 resíduos de aminoácido, sendo exatamente marginalmente maior do que um domínio de imunoglobulina único.

[000109] O conjunto de quatro alças, que preparam a bolsa de ligação,

mostra a plasticidade estrutural pronunciada e tolera uma variedade de cadeias laterais. O sítio de ligação pode, desse modo, ser remoldado em um processo proprietário para reconhecer as moléculas-alvo prescritas de diferente forma com afinidade e especificidade elevadas.

[000110] Uma proteína da família de lipocalina, a proteína de ligação de bilina (BBP) de *Pieris Brassicae* foi usada para desenvolver anticalinas por mutagênese do conjunto de quatro alças. Um exemplo de um pedido de patente que descreve "anticalinas" é PCT WO 199916873.

(vi) Affilin – Proteínas Scil

[000111] As moléculas de Affilin® são proteínas de não imunoglobulina pequenas que são designadas para afinidades específicas para proteínas e moléculas pequenas. As novas moléculas de Affilin® podem ser muito rapidamente selecionadas de duas bibliotecas, cada das quais é com base em uma proteína de andaime derivada humana diferente.

[000112] As moléculas de Affilin® não mostram qualquer homologia estrutural às proteínas de imunoglobulina. As proteínas de Scil empregam dois andaimes de Affilin®, um dos quais é gama cristalino, uma proteína estrutural da lente do olho humano e o outro são proteínas da superfamília de "ubiquitina". Ambos os andaimes humanos são muito pequenos, mostram estabilidade em temperatura elevada e são quase resistentes às alterações de pH e agente de desnaturação. Esta estabilidade elevada é principalmente devido a estrutura de beta folha expandida. Os exemplos de proteínas derivadas gama cristalinas são descritos em WO200104144 e os exemplos de proteína "semelhantes a ubiquitina" são descritos em WO2004106368

(vii) Miméticos de epítipo de proteína (PEM)

[000113] PEM são moléculas semelhantes ao peptídeo, cíclicas, de tamanho médio (MW 1-2kDa) imitando as estruturas secundárias em

forma de beta-grampo de cabelo de proteínas, a principal estrutura secundária envolvida nas interações de proteína-proteína.

Estrutura ou construção de Fc

[000114] Os anticorpos construídos da invenção incluem aqueles nos quais as modificações foram feitas para resíduos de estruturas em V_H e/ou V_L , por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente tais modificações de estrutura são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem é para "mutar de volta" um ou mais resíduos de estrutura para a sequência de linha germinativa correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que tenha sofrido mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da sequência de linha germinativa da qual o anticorpo é derivado. Tais resíduos podem ser identificados comparando-se as sequências de estrutura de anticorpo com as sequências de linha germinativa das quais o anticorpo é derivado. Para retornar para sequências de região de estrutura para sua configuração de linha germinativa, as mutações somáticas podem ser "mutadas de volta" para a sequência de linha germinativa por, por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR. Tais anticorpos "mutados de volta" são também pretendidos serem abrangidos pela invenção.

[000115] Outro tipo de modificação de estrutura envolve mutar um ou mais resíduos na região de estrutura, ou mesmo em uma ou mais regiões de CDR, para remover os epítomos de célula T para, desse modo, reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Esta abordagem é também referida como "desimunização" e está descrita em detalhes adicionais na Publicação de Patente US Nº 20030153043 por Carr e outros.

[000116] Além disso ou alternativa para as modificações feitas na estrutura ou regiões de CDR, os anticorpos da invenção podem ser

construídos para incluir modificações na Região de Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como, meia vida do soro, fixação do complemento, ligação do receptor de Fc, e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais porções químicas podem estar presas ao anticorpo) ou serem modificadas para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada destas modalidades está descrita em detalhes adicionais abaixo. A numeração de resíduos na região de Fc é aquela do índice EU de Kabat.

[000117] Em uma modalidade, a região de articulação de CH1 é modificada tal que o número de resíduos de cisteína na região de articulação seja alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Esta abordagem é descrita também na Patente US Nº 5.677.425 por Bodmer e outros. O número de resíduos de cisteína na região de articulação de CH1 é alterado para, por exemplo, facilitar a montagem das cadeias longas e curtas ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

[000118] Em outra modalidade, a Região de articulação de Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região de interface de domínio de CH2-CH3 do fragmento de articulação de Fc tal que o anticorpo tenha a ligação da proteína A de *Staphylococcyi* (SpA) comprometida relativo a ligação de SpA de domínio de articulação de Fc. Esta abordagem é descrita em detalhes adicionais na Patente US Nº 6.165.745 por Ward e outros.

[000119] Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia vida biológica. Várias abordagens são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, como descrito na Patente US Nº

6.277.375 por Ward. Alternativamente, para aumentar a meia vida biológica, o anticorpo pode ser alterado na região de CH1 ou CL para conter um epítopo de ligação de receptor de recuperação tomado de duas alças de um domínio CH2 de uma região de Fc de um IgG, como descrito nas Patentes US Nº. 5.869.046 e 6.121.022 por Presta e outros.

[000120] Em ainda outras modalidades, a região de Fc é alterada substituindo-se pelo menos um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar as funções efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente tal que o anticorpo tenha uma afinidade alterada para um ligante efector, porém retenha a capacidade de ligação de antígeno do anticorpo de origem. O ligante efector para o qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor de Fc ou o componente de C1 do complemento. Esta abordagem é descrita em detalhes adicionais nas Patentes US Nº 5.624.821 e 5.648.260, ambos por Winter e outros.

[000121] Em outra modalidade, um ou mais aminoácidos selecionados de resíduos de aminoácido podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente tal que o anticorpo tenha ligação de C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) reduzida ou abolida. Esta abordagem é descrita em detalhes adicionais na Patente US Nº 6.194.551 por Idusogie e outros.

[000122] Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácido são alterados para desse modo alterar a capacidade do anticorpo de fixar o complemento. Esta abordagem está descrita também na Publicação PCT WO 94/29351 por Bodmer e outros.

[000123] Em ainda outra modalidade, a região de Fc é modificada para aumentar a capacidade do anticorpo de mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo para um receptor de Fcγ modificando-se um ou mais

aminoácidos. Esta abordagem é descrita também na Publicação PCT WO 00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humano para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e as variantes com ligação melhorada foram descritas (vide, Shields, R.L. e outros, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

[000124] Em ainda outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo glicosilado pode ser feito (isto é, o anticorpo necessita de glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas por; por exemplo, alteração de um ou mais sítios de glicosilação na sequência de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas as quais resultem na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura de região variável para, desse modo, eliminar a glicosilação naquele sítio. Tal glicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno. Tal abordagem é descrita em detalhes adicionais nas Patentes US Nº 5.714.350 e 6.350.861 por Co e outros.

[000125] Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser feito o qual tenha um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado ou não fucosilado tendo quantidades reduzidas de ou nenhum resíduo de fucosila ou um anticorpo tendo estruturas de GlcNac de bifurcação aumentada. Tais padrões de glicosilação alterados foram demonstrados aumentar a capacidade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas por, por exemplo, expressão do anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. As células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais se expressa os anticorpos recombinantes da invenção para desse modo produzir um anticorpo com glicosilação

alterada. Por exemplo, EP 1.176.195 por Hang e outros descreve uma linhagem de célula com um gene FUT8 funcionalmente rompido, que codifica uma fucosil transferase, tal que os anticorpos expressos em uma tal linhagem celular exibam hipofucosilação ou sejam desprovidos de resíduos de fucosila. Portanto, em uma modalidade, os anticorpos da invenção são produzidos por expressão recombinante em uma linhagem celular que exhibe padrão de hipofucosilação ou não fucosilação, por exemplo, uma linhagem celular de mamífero com expressão deficiente do gene de FUT8 codificando fucosiltransferase. A Publicação PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linhagem celular de CHO variante, células Lecl3, com capacidade reduzida de prender fucose aos carboidratos ligado por Asn(297), também resultando na hipofucosilação de anticorpos expressos nesta célula hospedeira (vide, também Shields, R.L. e outros, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Publicação PCT WO 99/54342 por Umana e outros descreve as linhagens celular construídas para expressar as glicosil transferases de modificação de glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII)) tal que os anticorpos expressos nas linhagens celular construídas exibam estruturas de GlcNac de bifurcação aumentada que resulta em atividade de ADCC aumentada dos anticorpos (vide, também Umana e outros, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180). Eureka Therapeutics também descreve as células de mamífero de CHO geneticamente construídas capazes de produzir anticorpos com padrão de glicosilação de mamífero aletrado desprovido de resíduos de fucosila (http://www.eurekainc.com/about_us/companyoverview.html). Alternativamente, os anticorpos da invenção podem ser produzidos em curtiduras ou fungos filamentosos construídos para padrão de glicosilação semelhante ao mamífero e capazes de produzir anticorpos que necessitam de fucose como padrão de glicosilação (vide, por exemplo, EP1297172B1).

[000126] Outra modificação dos anticorpos aqui que é contemplada pela invenção é a pegilação. Um anticorpo pode ser pegilado para, por exemplo, aumentar a meia vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Para pegar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, tipicamente é reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado de aldeído de PEG, em condições nas quais um ou mais grupos PEG ficam presos ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. A pegilação pode ser realizada por uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Como usado aqui, o termo "polietileno glicol" é pretendido abranger quaisquer das formas de PEG que foram usadas para derivar outras proteínas, tal como (C1-C10) alcóxi- ou arilóxi-polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. Em certas modalidades, o anticorpo a ser pegilado é um anticorpo aglicosilado. Os métodos para a pegilação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide, por exemplo, EP 0 154 316 por Nishimura e outros e EP 0 401 384 por Ishikawa e outros.

[000127] Outra modificação dos anticorpos que é contemplada pela invenção é um conjugado ou uma fusão de proteína pelo menos da região de ligação de antígeno do anticorpo da invenção para proteína do soro, tal como albumina de soro humano ou um fragmento do mesmo para aumentar a meia vida da molécula resultante. Tal abordagem é, por exemplo, descrita em Ballance e outros EP0322094.

[000128] Outra possibilidade é uma fusão pelo menos da região de ligação de antígeno do anticorpo da invenção para as proteínas capazes de se ligar às proteínas do soro, tal como albumina de soro humano para aumentar a meia vida da molécula resultante. Tal abordagem é, por exemplo, descrita em Nygren e outros, EP 0 486 525.

Métodos de construção de anticorpos alterados

[000129] Como descrito acima, os anticorpos anti-BAFFR tendo sequências de V_H e V_L ou sequências de cadeia curta e longa de tamanho natural mostrados aqui podem ser usados para criar novos anticorpos anti-BAFFRs por modificação de sequências de cadeia longa e/ou cadeia curta de tamanho natural, sequências de V_H e/ou V_L , ou as constantes de região presas a estas. Desse modo, em outro aspecto da invenção, as características estruturais de um anticorpo anti-BAFFR da invenção são usadas para criar anticorpos anti-BAFFR estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como a ligação ao BAFFR humano e também inibindo uma ou mais propriedades funcionais de BAFFR (por exemplo, atividade antagonística, atividade de depleção de célula B).

[000130] Por exemplo, uma ou mais regiões de CDR dos anticorpos da presente invenção, ou mutações dos mesmos, podem ser combinadas recombinantemente com regiões de estrutura conhecidas e/ou outros CDRs para criar anticorpos anti-BAFFR adicionais, recombinantemente construídos, da invenção, como descrito acima. Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na seção anterior. O material de partida para o método de construção é uma ou mais das sequências de V_H e/ou V_L fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas. Para criar o anticorpo construído, não é necessário atualmente preparar (isto é, expressar como uma proteína) um anticorpo tendo uma ou mais das sequências de V_H e/ou V_L fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas. De preferência, a informação contida na sequência(s) é usada como o material de partida para criar uma sequência(s) de "segunda geração" derivada da sequência(s) original e então a sequência de "segunda geração" é preparada e expressa como uma proteína.

[000131] Consequentemente, em outra modalidade, a invenção

fornece um método para a preparação de um anticorpo anti-BAFFR consistindo em: uma sequência de anticorpo de região variável de cadeia longa tendo uma sequência de CDR1 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1-7, uma sequência de CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8-14 e/ou uma sequência de CDR3 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 15-21; e uma sequência de anticorpo de região variável de cadeia curta tendo uma sequência de CDR1 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22- 28, uma sequência de CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 29-35 e/ou uma sequência de CDR3 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 36-42; alterando pelo menos um resíduo de aminoácido na sequência de anticorpo de região variável de cadeia longa e/ou na sequência de anticorpo de região variável de cadeia curta para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

[000132] Consequentemente, em outra modalidade, a invenção fornece um método para preparar um anticorpo anti-BAFFR otimizado para a expressão em uma célula de mamífero consistindo em: uma sequência de anticorpo de cadeia longa de tamanho natural tendo uma sequência selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 75-78; e uma sequência de anticorpo de cadeia curta de tamanho natural tendo uma sequência selecionada do grupo de 71-74; alterar pelo menos um resíduo de aminoácido na sequência de anticorpo de cadeia longa de tamanho natural e/ou a sequência de anticorpo de cadeia curta de tamanho natural para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

A sequência de anticorpo alterada pode também ser preparada por avaliação das bibliotecas de anticorpo tendo sequências

de CDR3 fixadas selecionadas entre o grupo consistindo em SEQ ID NO:15-21 e SEQ ID NO: 36-42 ou determinantes de ligação essencial mínima como descrito em US20050255552 e diversidade em sequências de CDR1 e CDR2. A avaliação pode ser realizada de acordo com qualquer tecnologia de avaliação apropriada para avaliar anticorpos de bibliotecas de anticorpo, tais como tecnologia de exibição de fago.

[000133] As técnicas de biologia molecular padrões podem ser usadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterada. O anticorpo codificado pelas sequências de anticorpo alteradas é aquele que retém uma, algumas ou todas as propriedades funcionais dos anticorpos anti-BAFFR descritos aqui, cujas propriedades funcionais incluem, porém não estão limitadas a, especificamente se ligar ao BAFFR humano; e/ou inibe a proliferação de célula B induzida por BLyS, B induzido por BLyS ou produção de IgG1 induzida por BLyS; e/ou depauper a célula B humana *in vitro* ou *in vivo*.

[000134] O anticorpo alterado pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais descritas acima.

[000135] As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas usando ensaios padrões disponíveis na técnica e/ou descritos aqui, tais como aqueles apresentados nos exemplos (por exemplo, ELISAs).

[000136] Em certas modalidades dos métodos de construção de anticorpos da invenção, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ou seletivamente ao longo de todo ou parte de uma sequência de codificação de anticorpo anti-BAFFR e o anticorpo modificado anti-BAFFRs resultante pode ser avaliado quanto à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais como descrito aqui. Os métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, a Publicação PCT WO 02/092780 por Short descreve os métodos para

criar e avaliar as mutações de anticorpo usando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação dos mesmos. Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 por Lazar e outros descreve métodos de uso de métodos de avaliação computacional para otimizar as propriedades físicoquímicas dos anticorpos.

Moléculas de ácido nucleico codificando os anticorpos da invenção

[000137] Outro aspecto da invenção pertence às moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. Os exemplos de sequências de nucleotídeo de cadeia curta de tamanho natural ideais para a expressão em uma célula de mamífero são mostrados na SEQ ID NOs:83-86. Os exemplos de sequências de nucleotídeo de cadeia longa de tamanho natural ideais para a expressão em uma célula de mamífero são mostrados em SEQ ID NOs: 79-82.

[000138] Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado de célula, ou podem ser ácidos nucleicos em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado" ou "produzido substancialmente puro" quando purificado longe de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, por técnicas padrões, incluindo tratamento alcalino/SDS, padrão de bandas de CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese de gel de agarose e outras bem conhecidas na técnica. Vide, F. Ausubel, e outros, ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, Nova Iorque. Um ácido nucleico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter sequências intrônicas. Em uma modalidade, o ácido nucleico é uma molécula de cDNA. O ácido nucleico pode estar presente em um vetor tal como um vetor de exibição de fago, ou em um vetor de plasmídeo

recombinante.

[000139] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos usando técnicas de biologia molecular padrão. Para os anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados de camundongos transgênicos carregando genes de imunoglobulina como descrito também abaixo), os cDNAs codificando as cadeias longas e curtas do anticorpo feitas pelo hibridoma podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão ou técnicas de clonagem de cDNA. Para os anticorpos obtidos de uma biblioteca de gene de imunoglobulina (por exemplo, usando técnicas de exibição de fago), ácido nucleico codificando o anticorpo pode ser recuperado de vários clones de fago que são os membros da biblioteca.

[000140] Uma vez que os fragmentos de DNA codificando os segmentos de V_H e V_L são obtidos, estes fragmentos de DNA podem ser também manipulados por técnicas de DNA recombinante padrão, por exemplo, para converter os genes de região variável para genes de cadeia de anticorpo de tamanho natural, para genes de fragmento de Fab ou para um gene de scFv. Nestas manipulações, um fragmento de DNA codificando V_L ou V_H é operativamente ligado a outra molécula de DNA, ou a um fragmento codificando outra proteína para um fragmento codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligador flexível. O termo "operativamente ligado", como usado neste contexto, é pretendido significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de uma maneira funcional, por exemplo, tal que as sequências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam na estrutura, ou tal que a proteína seja expressa sob controle de um promotor desejado.

[000141] O DNA isolado codificando a região de V_H pode ser convertido para um gene de cadeia longa de tamanho natural operativamente ligando-se o DNA de codificação de V_H a outra molécula

de DNA codificando as regiões constantes de cadeia longa (CH1, CH2 e CH3). As sequências de genes humanos de região constante de cadeia longa são conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Kabat, E. A., e outros, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH Nº 91-3242) e fragmentos de DNA abrangendo estas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia longa pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD. Em algumas modalidades, a região constante de cadeia longa é selecionada entre os isótipos de IgG1. Para um gene de cadeia longa de fragmento de Fab, o DNA de codificação de V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA codificando somente a região constante de cadeia longa de CH1.

[000142] O DNA isolado codificando a região de V_L pode ser convertido para um gene de cadeia curta de tamanho natural (como também para um gene de cadeia curta gene de Fab) operativamente ligando-se o DNA de codificação de V_L a outra molécula de DNA codificando a região constante de cadeia curta, C_L . As sequências de genes humanos de região constante de cadeia curta são conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Kabat, E. A., e outros, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH No. 91-3242) e fragmentos de DNA abrangendo estas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia curta pode ser uma região constante capa ou lambda.

[000143] Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA de codificação de V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligador flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácido $(Gly_4-Ser)_3$, tal que as sequências V_H e V_L possam ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com as regiões

de V_L e V_H unidas pelo ligador flexível (vide, por exemplo, Bird e outros, 1988 Science 242:423-426; Huston e outros, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty e outros, 1990 Nature 348:552-554).

Geração de anticorpos monoclonais da invenção

[000144] Os anticorpos monoclonais (mAbs) podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein, 1975 Nature 256: 495. Muitas técnicas para produzir o anticorpo monoclonal podem ser empregadas, por exemplo, por transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

[000145] Um sistema animal para a preparação de hibridomas é o sistema de murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento bem estabelecido. Os protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Os pares de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

[000146] Os anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal de murinho preparado como descrito acima. O DNA codificando as imunoglobulinas de cadeia curta e longa pode ser obtido do hibridoma de murino de interesse e construídos para conter sequências de imunoglobulina de não murino (por exemplo, humana) usando as técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis de murinho podem ser ligadas às regiões constantes humanas usando os métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Patente US Nº 4.816.567 por Cabilly e outros). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões de CDR de murino podem ser inseridas em uma estrutura humana usando métodos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Patente US Nº

5225539 por Winter, e Patente US Nº 5530101; 5585089; 5693762 e 6180370 por Queen e outros.

[000147] Em uma certa modalidade, os anticorpos da invenção são anticorpos humanos monoclonais. Tais anticorpos humanos monoclonais direcionados contra BAFFR podem ser gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossômicos que carregam partes do sistema imune humano exceto o sistema do camundongo. Estes camundongos transgênicos ou transcromossômicos incluem os camundongos referidos aqui como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente, e são coletivamente referidos aqui como "camundongos de Ig humano".

[000148] O HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contém minilocal de gene de imunoglobulina humano que codifica as sequências de imunoglobulina de cadeia longa (μ e γ) e curta κ não reorganizadas humanas, junto com mutações alídeas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógena (vide, por exemplo, Lonberg, e outros, 1994 Nature 368(6474): 856-859). Consequentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo, e em resposta a imunização, os transgenes de cadeia curta e longa humanos introduzidos sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar IgG κ monoclonal humano de afinidade elevada (Lonberg, N. e outros, 1994 supra; revisado em Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). A preparação e uso de camundongos HuMAb, e as modificações genômicas carregadas por tais camundongos, é também descrita em Taylor, L. e outros, 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. e outros, 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon e outros, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi e outros, 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. e outros, 1993

EMBO J. 12: 821-830; Tuailon e outros, 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. e outros, 1994 International Immunology 579-591; e Fishwild, D. e outros, 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851). Vide, também, as Patentes US Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todas por Lonberg e Kay; Patente US Nº 5.545.807 por Surani e outros; Publicações PCT Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas por Lonberg e Kay; e Publicação PCT Nº WO 01/14424 por Korman e outros.

[000149] Em outra modalidade, os anticorpos humanos da invenção podem ser construídos usando um camundongo que carrega as sequências de imunoglobulina humanas em transgenes e transcromossomas tal como um camundongo que carrega um transgene de cadeia longa humano e um transcromossoma de cadeia curta humano. Tais camundongos, referidos aqui como "camundongos KM", são descritos em detalhes na Publicação PCT WO 02/43478 por Ishida e outros.

[000150] Entretanto, além disso, os sistemas de animal transgênico alternativos expressando genes de imunoglobulina humanos estão disponíveis na técnica e podem ser usados para construir os anticorpos anti-BAFFR da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como o Xenocamundongo (Abgenix, Inc.) pode ser usado. Tais camundongos são descritos em, por exemplo, Patentes US Nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 por Kucherlapati e outros.

[000151] Além disso, sistemas alternativos de animal transcromossômico expressando os genes de imunoglobulina humanos estão disponíveis na técnica e podem ser usados para construir os anticorpos anti-BAFFR da invenção. Por exemplo, os camundongos que carregam tanto um transcromossoma de cadeia longa humano quanto

um transcromossoma de cadeia curta humano, referido como "camundongo TC" pode ser usado; tais camundongos são descritos em Tomizuka e outros, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, as vacas que carregam transcromossomas de cadeia curta e longa humano foram descritas na técnica (Kuroiwa e outros, 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) e podem ser usadas para construir os anticorpos anti-BAFFR da invenção.

[000152] Os anticorpos recombinantes humanos da invenção também podem ser preparados usando métodos de exibição de fago para avaliar as bibliotecas de genes de imunoglobulina humanos. Tais métodos de exibição de fago para isolar anticorpos humanos são estabelecidos na técnica ou descritos nos exemplos abaixo. Vide, por exemplo: Patentes US Nº 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 por Ladner e outros; Patentes US Nº 5.427.908 e 5.580.717 por Dower e outros; Patentes US Nº 5.969.108 e 6.172.197 por McCafferty e outros; e Patentes US Nº 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 por Griffiths e outros.

[000153] Anticorpos humanos monoclonais da invenção também podem ser preparados usando camundongos SCID nos quais as células imunes humanas foram reconstituídas tal que a resposta de anticorpo humano pudesse ser gerada na imunização. Tais camundongos são descritos em, por exemplo, Patentes US Nº 5.476.996 e 5.698.767 por Wilson e outros.

Geração de hibridomas produzindo anticorpos humanos monoclonais

[000154] Para gerar hibridomas produzindo anticorpos humanos monoclonais da invenção, os esplenócitos e/ou células linfóide de camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos para uma linhagem celular imortalizada apropriada, tal como uma linhagem celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser

avaliados quanto à produção de antígeno-anticorpos específicos. Por exemplo, as suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos humanizados podem ser fundidas a um sexto do número de células de mieloma de camundongo de não segregação P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com 50% de PEG. As células são semeadas em aproximadamente 2 x 145 em placas de microtítulo de fundo plano, seguido por uma incubação de duas semanas em meio letivo contendo 20% de soro de clone fetal, 18% de meios condicionados "653", 5% de origen (IGEN), L-glutamina a 4 mM, piruvato de sódio a 1 mM, HEPES a 5mM, 2-mercaptoetanol a 0:055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e 1X de HAT (Sigma; o HAT é adicionado 24 horas após a fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio no qual o HAT é substituído com HT. As cavidades individuais podem então ser avaliadas por ELISA para anticorpos IgM e IgG monoclonais humanos. Uma vez que o crescimento de hibridoma extensivo ocorre, o meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas de segregação de anticorpo podem ser substituídos, avaliados novamente, e se ainda positive para IgG humano, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes por limitação da diluição. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

[000155] Para purificar os anticorpos humanos monoclonais, os hibridomas selecionados podem ser crescidos em frascos giratórios de dois litros para purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia por afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluído pode ser verificado por eletroforese de gel e cromatografia líquida de

alto desempenho para garantir pureza. A solução de tamponamento pode ser permutada em PBS, e a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ usando coeficiente de extinção 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Geração de transfectomas produzindo anticorpos monoclonais

[000156] Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinantes e métodos de transfecção de gene como é bem conhecido na técnica (por exemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

[000157] Por exemplo, para expressar os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo dos mesmos, os DNAs codificando cadeia longas e curtas parciais ou de tamanho natural, podem ser obtidos por técnicas de biologia molecular padrão (por exemplo, amplificação de PCR ou clonagem de cDNA usando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos em vetores de expressão tais que os genes sejam operativamente ligados às sequências de controle transcricionais e translacionais. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" é pretendido significar que um gene de anticorpo está ligado em um vetor tal que as sequências de controle transcricionais e translacionais no vetor sejam úteis em sua função pretendida de regulação da transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e sequências de controle de expressão são escolhidas por serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia curta de anticorpo e o gene de cadeia longa de anticorpo podem ser inseridos no vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos padrões (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no vetor e fragmento de gene de anticorpo, ou ligação

de extremidade cega se nenhum sítio de restrição estiver presente). A região variável de cadeias longas e curtas dos anticorpos descritos aqui pode ser usada para criar genes de anticorpo de tamanho natural de qualquer isótipo de anticorpo inserindo-os nos vetores de expressão já codificando as regiões de constante de cadeia longa e constante de cadeia curtas do isótipo desejado tal que o segmento de V_H seja operativamente ligado ao segmento CH no vetor e o segmento de V_L seja operativamente ligado ao segmento CL no vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo de sinal que facilita a segregação da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor tal que o peptídeo de sinal seja ligado na estrutura ao terminal de amino terminus do gene de cadeia de anticorpo. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína de não imunoglobulina).

[000158] Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "sequência reguladora" é pretendido incluir promotores, realçadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Tais sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Será apreciado por aqueles versados na técnica que o desígnio do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. As sequências reguladoras para a expressão

de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direcionam níveis elevados de expressão de proteína em células de mamífero, tais como promotores e/ou realçadores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), e polioma. Alternativamente, as sequências reguladoras não virais podem ser usadas, tal como o promotor de ubiquitina ou promotor de P-globina. Entretanto, além disso, os elementos reguladores compostos de sequências de diferentes fontes, tal como o sistema promotor de SRa, que contém as sequências do promotor precoce de SV40 e a repetição de terminal longo de vírus de leucemia de célula T humano tipo 1 (Takebe, Y. e outros, 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

[000159] Além dos genes de cadeia de anticorpo e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar as sequências adicionais, tais como as sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens da replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, Patentes US Nº 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todos por Axel e outros). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência aos fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Os genes marcadores selecionáveis incluem o gene de diidrofolato reductase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

[000160] Para a expressão das cadeias longas e curtas, o vetor de expressão codificando as cadeias curtas e longas é transfectado em uma célula hospedeira por técnicas padrões. As várias formas do termo "transfecção" são pretendidas abrangerem uma ampla variedade de

técnicas geralmente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação de cálcio-fosfato, transfecção de DEAE-dextrana e similares. É teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em qualquer das duas células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas. A expressão de anticorpos em células eucarióticas, em particular células hospedeiras de mamífero, é descrita por que tais células eucarióticas, e em células de mamífero particulares, são mais prováveis de que as células procarióticas de montar e segregar um anticorpo fracamente dobrado e imunologicamente ativo. A expressão procariótica dos genes de anticorpo foi reportada ser ineficaz para a produção de produtos elevados de anticorpo ativo (Boss, M. A. e Wood, C. R., 1985 *Imunology Today* 6:12-13).

[000161] As células hospedeiras de mamífero para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de *Hamster* Chinês (células de CHO) (incluindo células de CHO dhfr-, descritas em Urlaub e Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 usadas com um marcador selecionável de DH FR, por exemplo, como descrito em R.J. Kaufman e P.A. Sharp, 1982 *Mol. Biol.* 159:601-621, células de mieloma de NSO, células de COS e células de SP2). Em particular, para uso com Células de mieloma de NSO, outro sistema de expressão é o sistema de expressão de gene GS mostrado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338.841. Em uma modalidade, as células hospedeiras de mamífero para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem linhagens celulares de mamífero deficientes de expressão de gene FUT8, por exemplo, como descrito em US6,946.292B2. Quando os vetores de expressão recombinantes codificando os genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando-se as células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para

permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são crescidas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão.

Imunoconjugados

[000162] Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza um anticorpo anti-BAFFR, ou um fragmento do mesmo, conjugado para uma porção terapêutica, tal como uma citotoxina, um fármaco (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são referidos aqui como "imunoconjugados". Os imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são referidos como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial (por exemplo, mate) para as células. Os exemplos incluem taxon, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, t. colquicina, doxorubicina, daunorubicina, diona de antracina de di-hidróxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Os agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, decarbazina de 5-fluorouracil), agentes de remoção (por exemplo, mecloretamina, tioepa cloraxnbucil, meifalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e platino (II) de cis-diclorodiamina (DDP) cisplatina, antraciclinas (por exemplo, daunorubicina (antigamente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (antigamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

[000163] Outros exemplos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugados a um anticorpo da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas, e derivados dos mesmos. Um exemplo de um anticorpo conjugado de caliqueamicina está comercialmente disponibilizado (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

[000164] As citoxinas podem ser conjugadas para anticorpos da invenção usando tecnologia de ligador disponível da técnica. Os exemplos de tipos de ligadores que foram usados para conjugar uma citotoxina para um anticorpo incluem, porém não estão limitados a, hidrazonas, tio éteres, ésteres, dissulfetos, e ligadores contendo peptídeo. Um ligador pode ser escolhido isto é, por exemplo, susceptível a clivagem por pH baixo no compartimento lisossômico ou susceptível a clivagem por proteases, tal como proteases preferencialmente expressa em tecido de tumor tal como catepsinas (por exemplo, catepsinas B, C, D).

[000165] Para discussão adicional de tipos de citotoxinas, ligadores e métodos para conjugar os agentes terapêuticos para anticorpos, vide também Saito, G. e outros, 2003 Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. e outros, 2003 Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G., 2003 Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M., 2002 Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J., 2002 Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J., 2001 Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

[000166] Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados para um isótopo radioativo para gerar radiofarmacêuticos citotóxicos, também referido como radioimunoconjugados. Os exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados para anticorpos para uso diagnosticamente ou terapeuticamente incluem, porém não estão limitados a, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰, e lutécio¹⁷⁷. O método para preparar radioimunconjugado é estabelecido na técnica. Os exemplos de

radioimunoconjugados estão comercialmente disponibilizadas, incluindo Zevalin® (DEC Farmacêuticos) e Bexxar® (Corixa Farmacêuticos), e métodos similares podem ser usados para preparar radioimunoconjugados usando os anticorpos da invenção.

[000167] Os anticorpos conjugados da invenção podem ser usados para modificar uma determinada resposta biológica, e a fração de fármaco não deve ser considerada como limitada aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a fração de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou fragmento ativo dos mesmos, tais como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina de difteria; uma proteína tal como fator de necrose de tumor ou interferon- γ ; ou, modificadores de resposta biológicos tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator de estimulação de colônia de granulócito macrófago ("GM-CSF"), fator de estimulação de colônia de granulócito ("G-CSF"), ou outros fatores de crescimento.

[000168] As técnicas para conjugar tal fração terapêutica aos anticorpos são bem conhecidas, vide, por exemplo, Amon e outros, "monoclonal antibodies For Imunoalvoing Of Drugs In Cancer Therapy", in monoclonal antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld e outros (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom e outros, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson e outros (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Anticorpo Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera e outros (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibody For Cancer Detection And

Therapy, Baldwin e outros (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe e outros, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

[000169] Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza moléculas biespecíficas ou multiespecíficas que compreendem um anticorpo anti-BAFFR, ou um fragmento dos mesmos, da invenção. Um anticorpo da invenção, ou região de ligação de antígenos dos mesmos, pode ser derivado ou ligado a outra moléculas funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligante para um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios de ligação diferentes ou moléculas-alvo. O anticorpo da invenção pode na realidade ser derivado ou ligado a mais do que uma molécula funcional para gerar as moléculas multiespecíficas que se ligam a mais do que dois sítios de ligação diferentes e/ou moléculas-alvo; tais moléculas multiespecíficas são também pretendidas serem abrangidas pelo termo "molécula biespecífica" como usado aqui. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou outras formas) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tal como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação, tal que resulte em uma molécula biespecífica.

[000170] Consequentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas que compreendem pelo menos uma primeira especificidade de ligação para BAFFR e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo-alvo. Por exemplo, o segundo epítipo-alvo é outro epítipo de BAFFR diferente do primeiro epítipo-alvo. Outro exemplo é uma molécula biespecífica que compreende pelo menos uma primeira especificidade de ligação para BAFFR e uma

segunda especificidade de ligação para um epítopo em CD20.

[000171] Adicionalmente, para a invenção na qual a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode ainda incluir uma terceira especificidade de ligação, além do primeiro e segundo epítopo-alvo.

[000172] Em uma modalidade, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo dos mesmos, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ou um Fv de cadeia única. O anticorpo pode também ser um dímero de cadeia curta ou cadeia longa, ou qualquer fragmento mínimo dos mesmos tais como uma construção de cadeia única ou Fv como descrito em Ladner e outros Patente US Nº 4.946.778, os teores dos quais está expressamente incorporado por referência.

[000173] Outros anticorpos que podem ser empregados nas moléculas biespecífica da invenção são anticorpos monoclonais de murino, quimérico e humanizado.

[000174] As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas conjugando-se as especificidades de ligação constituintes, usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e em seguida conjugada a uma outra. Quando as especificades de ligação são proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação pode ser usada para conjugação covalente. Os exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), e 4-(N-maleimidometil) cicloexano-l-carboxilato de sulfossuccinimidila (sulfo-SMCC) (vide, por exemplo, Karpovsky e outros, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA e

outros, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan e outros, 1985 Science 229:81-83), e Glennie e outros, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Os agentes de conjugação são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

[000175] Quando as especificidades de ligação são os anticorpos, eles podem ser conjugados por ligação de sulfidrina da região de articulações de terminal de C das duas cadeias longas. Em uma modalidade particular, a região de articulação é modificada para conter um número ímpar de resíduos de sulfidrina, por exemplo, um, antes da conjugação.

[000176] Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente útil onde a molécula biespecífica for um mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x proteína de fusão de Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia única que compreende um anticorpo de cadeia única e um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia única que compreende dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Os métodos para preparar moléculas biespecíficas são descritos, por exemplo, na Patente US Número 5.260.203; Patente US Número 5.455.030; Patente US Número 4.881.175; Patente US Número 5.132.405; Patente US Número 5.091.513; Patente US Número 5.476.786; Patente US Número 5.013.653; Patente US Número 5.258.498; e Patente US Número 5.482.858.

[000177] A ligação das moléculas biespecíficas aos seus alvos específicos pode ser confirmada por, por exemplo, ensaio imussorvente

ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (REA), análise de FACS, bioensaio (por exemplo, inibição de crescimento), ou ensaio de Mancha do Oeste. Cada destes ensaios geralmente detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de interesse particular empregando-se um reagente rotulado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse.

Anticorpos Multivalentes

[000178] Em outro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos multivalentes que compreendem pelo menos duas porções de ligação de antígenos idênticas ou diferentes dos anticorpos da invenção ligando-se a BAFFR. Em uma modalidade, os anticorpos multivalentes fornecem pelo menos duas, três, ou quatro porções de ligação de antígenos dos anticorpos. A porção de ligação de antígenos pode ser ligada através da fusão de proteína ou ligação covalente ou não covalente. Alternativamente, os métodos de ligação foram descritos para as moléculas biespecíficas. Os compostos tetravalentes podem ser obtidos, por exemplo, reticulando-se anticorpos dos anticorpos da invenção com um anticorpo que se liga às regiões constantes dos anticorpos da invenção, por exemplo, a região de articulação ou Fc.

Composições Farmacêuticas

[000179] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção de ligação de antígeno dos mesmos, da presente invenção, formuladas junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de (por exemplo, dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos que se liga à diferentes epítopos no antígeno-alvo ou que tem atividades

complementares.

[000180] As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-BAFFR da presente invenção combinado com pelo menos um outro anti-inflamatório ou outro agente quimioterapêutico, por exemplo, um agente citotóxico, anticâncer ou antiproliferativo. Os exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados em terapia de combinação são descritos em maiores detalhes abaixo na sessão em usos dos anticorpos da invenção.

[000181] Como usado aqui, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento de absorção e isotônicos, e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. O veículo deve ser adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da rotina de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, imunoconjugado, ou molécula biespecífica, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

[000182] Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis. Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retenha a atividade biológica desejada do composto de origem e não transmita qualquer efeito toxicológico evidente (vide, por exemplo, Berge, S.M., e outros, 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19). Os exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como ácido clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobromico, hidriódico, fosfórico e

similares, como também de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos mono e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos substituídos por fenila, ácidos alcanoicos de hidróxi, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos e sulfônicos aromáticos e similares. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais de terra alcalina, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, como também, de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

[000183] A composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Os exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfato de sódio, sulfeto de sódio, e similares; os antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol, e similares; e agentes de quelação de metal, tais como ácido cítrico, ácido tetra-acético de etilenodiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e similares.

[000184] Os exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similares), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela conservação do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

[000185] Estas composições podem conter adjuvantes tais como

preservativos, agentes umectantes, agentes emulsificantes, e agentes dispersantes. A prevenção de presença de micro-organismos pode ser garantida tanto por procedimentos de esterilização, supra, quanto pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, e similares. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e similares nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetada pode ser causada pela inclusão de agentes que retardam a absorção tal como, monoestearato de alumínio e gelatina.

[000186] Os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis ou e pós-estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio convencional ou agente é incompatível com o composto ativo, o uso dos mesmos nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

[000187] As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis nas condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para a concentração de fármaco elevada. O veículo pode ser um meio de solvente ou dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez mais apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela conservação do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, alguém pode

incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio, na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser realizada incluindo-se na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, gelatina e sais de monoestearato.

[000188] As revisões do desenvolvimento de formulações de proteína estáveis (por exemplo, anticorpo) podem ser encontradas em Cleland e outros (1993) *Crit. Reviews. Ther. Drug Carrier Systems* 10(4):307-377 e Wei Wang (1999) *Int. J. Pharmaceutics* 185:129-88. As descrições de formulação adicionais para anticorpos podem ser encontradas, por exemplo, em Daugherty e Mersny (2006) *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 686-706; US 6171586; US4618486; US20060286103; WO06044908; WO07095337; WO04016286; Colandene e outros (2007) *J. Pharm. Sci* 96:1598-1608; Schulman (2001) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:S6-S11 e outras referências conhecidas.

[000189] As soluções ou suspensões usadas para a aplicação intradérmica ou subcutânea tipicamente incluem um ou mais dos seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenos glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool de benzila ou parabenos de metila; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes de quelação tais como ácido etilenodiaminatetra-acético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos; e agentes para o ajuste de tonicidade tal como dextrose de cloreto de sódio. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Tais preparações podem ser colocadas em ampolas, seringas descartáveis ou múltiplos frascos de dose feitos de vidro ou plástico.

[000190] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o anticorpo da invenção na quantidade requerida em

um solvente adequado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, quando requerido, seguido por microfiltração por esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós-estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente filtrada estéril dos mesmos.

[000191] Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo da invenção é administrada por, por exemplo, injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, o agente de ligação estará na forma de uma solução aquosa livre de pirogênio, parenteralmente aceitável. A preparação de tais soluções de proteína parenteralmente aceitáveis, tendo devida consideração ao pH, isotonicidade, estabilidade, e similares, está na habilidade da técnica. Uma composição farmacêutica preferida para injeção intravenosa, cutânea, ou subcutânea deve conter, além de agentes de ligação, um veículo isotônico tal como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de dextrose, injeção de dextrose e cloreto de sódio, injeção de Ringer lactada, ou outros veículos como conhecido na técnica. A composição farmacêutica(s) da presente descrição pode também conter estabilizantes, preservativos, tampões, antioxidantes, ou outros aditivos conhecidos por aqueles versados na técnica.

[000192] A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material de veículo para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do paciente sendo tratado, e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material de veículo para produzir uma forma de

dosagem única geralmente será aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, ou de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável.

[000193] Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o passar do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular as composições parentais na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. A forma de unidade de dosagem como usado aqui refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os pacientes a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção é ditada por e diretamente dependente das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser obtido, e das limitações inerentes na técnica de composição de um composto ativo para o tratamento de sensibilidade nos indivíduos.

[000194] Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais geralmente de 0,01 a 5 mg/kg, do peso corpóreo do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser 0,3 mg/kg de peso corpóreo, 1 mg/kg de peso corpóreo, 3 mg/kg de peso corpóreo, 5 mg/kg de peso corpóreo ou 10 mg/kg de peso corpóreo ou

dentro da faixa de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar envolve a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses, ou uma vez a cada três a 6 meses. Os regimes de dosagem para um anticorpo anti-BAFFR da invenção incluem 1 mg/kg de peso corpóreo ou 3 mg/kg de peso corpóreo por administração intravenosa, com o anticorpo sendo dado usando um dos seguintes esquemas de dosagem a cada quatro semanas para seis dosagens, em seguida a cada três meses; a cada três semanas; 3 mg/kg de peso corpóreo uma vez seguido por 1 mg/kg de peso corpóreo a cada três semanas.

[000195] Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, em cujo caso a dosagem de cada anticorpo administrado se inclui nas faixas indicadas. O anticorpo é geralmente administrado em múltiplas ocasiões. Os intervalos entre as dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanalmente, mensalmente, a cada três meses ou anualmente. Os intervalos também podem ser irregulares como indicado medindo-se os níveis sanguíneos do para o antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para obter uma concentração de anticorpo no plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml.

[000196] Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação prolongada, em cujo caso a administração menos frequente é requerida. A dosagem e frequência variam dependendo da meia vida do anticorpo no paciente. Em geral, os anticorpos humanos mostram a meia vida mais longa, seguido por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações

profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente infrequentes durante um período longo de tempo. Alguns pacientes continuam a receber o tratamento pelo resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente elevada em intervalos relativamente curtos é algumas vezes requerida até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada ou até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Por conseguinte, o paciente pode ser administrado em um regime profilático.

[000197] Os níveis de dosagem atuais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados para obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração particular, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, ou do éster, sal ou amida dos mesmos, da rotina de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular sendo empregado, da duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente sendo tratado, e outros fatores bem conhecidos nas técnicas medicinais.

[000198] Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-BAFFR da invenção pode resultar em uma diminuição da gravidade dos sintomas da doença, uma diminuição na frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença, ou na prevenção de prejuízo ou desestabilidade devido à aflição da doença.

[000199] Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma ou mais rotinas de administração usando uma ou

mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciada pelo técnico versado, a rotina e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. As rotinas de administração para anticorpos da invenção incluem rotina intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras rotinas parenterais de administração, por exemplo, por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral" como usado aqui significa os modos de administração exceto administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueana, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intraesternal.

[000200] Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser administrado por uma rotina não parenteral, tal como uma rotina tópica, epidérmica ou mucosal de administração, por exemplo, intranasalmente, oralmente vaginalmente, retalmente, sublingualmente ou topicamente.

[000201] Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação de microencapsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tal como acetato de etileno vinila, polianidretos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteadas ou geralmente conhecidas por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

[000202] Composições terapêuticas podem ser administradas com

dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmico sem agulha, tal como os dispositivos mostrados nas Patentes US Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 ou 4.596.556. Os exemplos de módulos e implantes bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente dos Estados Unidos No. 4.487.603, que mostra uma bomba de microinfusão implantável para dispersar a medicação em uma taxa controlada; Patente dos Estados Unidos No. 4.486.194, que mostra um dispositivo terapêutico para a administração de medicamentos através da pele; Patente dos Estados Unidos No. 4.447.233, que mostra uma bomba de infusão de medicação para a liberação da medicação em uma taxa de infusão precisa; Patente dos Estados Unidos No. 4.447.224, que mostra um aparato de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua de fármaco; Patente dos Estados Unidos No. 4.439.196, que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico tendo compartimentos de multicâmara; e Patente dos Estados Unidos No. 4.475.196, que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico. Muitos outros tais implantes, e módulos são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[000203] Em certas modalidades, os anticorpos humanos monoclonais da invenção podem ser formulados para garantir a distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para os métodos de fabricação de lipossomas, vide, por exemplo, as Patentes US 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais frações que são seletivamente transportadas em células ou órgãos específicos, desse modo realçando a liberação de

fármaco alvejada (vide, por exemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). As frações alvejantes exemplares incluem folato ou biotina (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos 5.416.016 por Low e outros); manosídeos (Umezawa e outros, 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (P.G. Bloeman e outros, 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais e outros, 1995 Antimicrob. Agents Chernother. 39:180); receptor de proteína A de tensoativo (Briscoe e outros, 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier e outros, 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); vide, também K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Usos e métodos da invenção

[000204] Os anticorpos da presente invenção têm utilidades de diagnóstico e terapêuticas *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas às células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *in vivo*, ou em um paciente, por exemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir, ou diagnosticar uma variedade de distúrbios. O termo "paciente" como usado aqui é pretendido incluir animais humanos e não humanos. Os animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios, e répteis.

[000205] Os métodos são particularmente adequados para tratar, prevenir ou diagnosticar distúrbios relacionados com BAFFR e/ou doenças imunes, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide.

[000206] A invenção também fornece métodos para depleção de células B em um animal, preferivelmente depleção ou morte de célula B humana administrando-se uma composição que compreende uma dose terapeuticamente eficiente dos anticorpos da invenção.

[000207] Como usado aqui, "um distúrbio relacionado com BAFFR" inclui condições associadas com ou caracterizadas por níveis de BLyS aberrantes e/ou doenças ou condições que possam ser tratadas por depleção ou morte de células B. Estas incluem condições inflamatórias, alergias e condições alérgicas, reações de hipersensibilidade, doenças imunes, infecções graves, e rejeição a transplante de órgão ou tecido. Estas também incluem neoplasmas de célula B.

[000208] Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser usados para o tratamento de recipientes de transplante de coração, pulmão, coração-pulmão combinado, fígado, rim, pancreático, pele ou córnea, incluindo rejeição de aloenxerto ou rejeição de xenoenxerto, e para a prevenção de doença de enxerto versus hospedeiro, tal como em seguida ao transplante da medula óssea, e transplante de órgão associado à arteriosclerose.

[000209] Os anticorpos da invenção são úteis para o tratamento, prevenção ou melhora da doença autoimune e de condições inflamatórias, em particular condições inflamatórias com uma etiologia incluindo um componente autoimune tal como artrite (por exemplo, artrite reumatoide, artrite crônica progrediente e artrite deformante) e doenças reumáticas, incluindo condições inflamatórias e doenças reumáticas envolvendo perda óssea, dor inflamatória, espondiloartropatias incluindo espondilite ancilosante, síndrome de Reiter, artrite reativa, artrite psoriática, e artrite enterofática, hipersensibilidade (incluindo tanto hipersensibilidade das vias aéreas quanto hipersensibilidade dérmica) e alergias. As doenças autoimunes específicas para que os anticorpos da invenção possam ser empregados incluem distúrbios hematológicos autoimunes (incluindo, por exemplo, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia eritrocitária pura e trombocitopenia idiopática), hemofilia adquirida A, doença de crioaglutinina, crioglobulinemia, púrpura trombocitopênica trombótica,

Síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, distúrbios inflamatórios do músculo, policondrite, esclerodoma, vasculite associada ao anticorpo citoplásmico antineutrófilo, neuropatia mediada por IgM, síndrome do mioclônus opsoclônus, granulomatose de Wegener, dermatomiosite, hepatite ativa crônica, miastenia grave, psoríase, síndrome de Steven-Johnson, pênfigo vulgar, pênfigo lameliforme, espru idiopático, doença inflamatória do intestino auto-imune (incluindo, por exemplo, colite ulcerativa, doença de Crohn e Síndrome do intestino irritável), oftalmopatia endócrina, doença de Grave, sarcoidose, esclerose múltipla, neuromielite óptica, cirrose biliar primária, diabetes juvenil (diabetes melito tipo I), uveíte (panuveíte anterior, intermediária e como também posterior), ceratoconjuntivite seca e ceratoconjuntivite vernal, fibrose pulmonar intersticial, artrite psoriática e glomerulonefrite (com e sem síndrome nefrótica, por exemplo, incluindo síndrome nefrótica idiopática ou nefropatia de alteração mínima), tumores, doença inflamatória da pele e córnea, miosite, afrouxamento de implantes ósseos, distúrbios metabólicos, tais como aterosclerose, diabetes, e dislipidemia.

[000210] Os anticorpos da invenção são também úteis para o tratamento, prevenção ou melhora de asma, bronquite, pneumoconiose, enfisema pulmonar, e outras doenças obstrutivas ou inflamatórias das vias aéreas.

[000211] Os anticorpos da invenção são também úteis para tratar doenças do metabolismo ósseo incluindo osteoartrite, osteoporose e outras artrites inflamatórias, e perda óssea em geral, incluindo perda óssea relacionada com a idade, e em particular, doença periodontal.

[000212] Uma vez que a ligação de BAFFR aos linfócitos do sangue periférico humano e à linhagem de célula B é mediada pelos polipeptídeo de BAFFR, os anticorpos da invenção também podem ser úteis na diagnose ou tratamento de neoplasmos de célula B. Os

exemplos de tais doenças e condições incluem, porém não estão limitados a, linfomas de não Hodgkin de célula B, tais como linfoma linfocítico pequeno, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma de células de revestimento, linfoma folicular, linfoma do tecido linfoide associado a mucosa, linfoma da célula grande difusa, e linfoma de Burkitt; leucemia B-linfoblástica precursora; e leucemia linfocítica crônica de célula B, e mieloma múltiplo. Outros neoplasmas de célula B são abrangidos no escopo da invenção.

[000213] Os anticorpos da invenção podem ser administrados como o ingrediente ativo sozinho ou em conjunto com, por exemplo, como um adjuvante a ou em combinação com, outros fármacos, por exemplo, agentes ou imunomoduladores ou outros agentes anti-inflamatórios ou outros agentes citotóxicos ou anticâncer, por exemplo, para o tratamento ou prevenção de doenças mencionadas acima. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser usados em combinação com DMARD, por exemplo, sais de Gold, sulfasalazina, antimalárias, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glicocorticoides; um inibidor de calcineurina, por exemplo, ciclosporina A ou FK 506; um modulador de recirculação de linfócito, por exemplo, análogos de FTY720 e FTY720; um inibidor de mTOR, por exemplo, rapamicina, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 ou TAFA-93; uma ascomicina tendo propriedades imunossupressoras, por exemplo, ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclo-fos-famida; azatiopreno; metotrexato; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil de mico-feno-lato; 15-deoxispergualina ou um homólogo imunossupressor, análogo ou derivado dos mesmos; anticorpos monoclonais imunossupressores, por exemplo, anticorpos monoclonais para receptores de leucócito, por exemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD11a, CD25, CD28, CD40, CD45, CD52, CD58,

CD80, CD86 ou seus ligantes; outros compostos imunomoduladores, por exemplo, uma molécula de ligação recombinante tendo, pelo menos, uma porção do domínio extracelular de CTLA4 ou um mutante dos mesmos, por exemplo, pelo menos uma porção extracelular de CTLA4 ou um mutante dos mesmos unidos a uma sequência de proteína de não CTLA4, por exemplo, CTLA4Ig (por exemplo, designado ATCC 68629) ou um mutante dos mesmos, por exemplo, LEA29Y; inibidores de molécula de adesão, por exemplo, antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 ou -3, antagonistas de VCAM-4 ou antagonistas de VLA-4; ou um agente quimioterapêutico, por exemplo, paclitaxel, gencitabina, cisplatina, doxorrubicina ou 5-fluorouracil; agentes anti TNF, por exemplo, anticorpos monoclonais para TNF, por exemplo, infliximab, adalimumab, CDP870, ou construções de receptores para TNF-RI ou TNF-RII, por exemplo, Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueadores de citocinas pró-inflamatórias, bloqueadores de IL-1, por exemplo, Anakinra ou IL-1 trap, bloqueadores de AAL160, ACZ 885, IL-6; bloqueadores de quimiocina, por exemplo, inibidores ou ativadores de proteases, por exemplo, metaloproteases, anticorpos anti-IL4, anticorpos anti-IL-15, anticorpos anti-IL-6, anticorpos anti-IL-21, anticorpos anti-IL-12, anticorpos anti-p40, anticorpos anti-IL-17, anticorpos anti-CD20, NSAIDs, tais como aspirina ou um agente anti-infeccioso (lista não limitada ao agente mencionado).

[000214] De acordo com os anteriores a presente invenção fornece em um outro aspecto adicional:

[000215] Um método como definido acima que compreende coadministração, por exemplo, concomitantemente ou em sequência, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de BAFFR, por exemplo, um anticorpo da invenção, e pelo menos uma segunda substância de fármaco, a referida segunda substância de fármaco sendo um fármaco imunossupressor/imunomodulador, anti-

inflamatório quimioterapêutico ou anti-infeccioso, por exemplo, como indicado acima.

[000216] Ou, uma combinação terapêutica, por exemplo, um *kit*, que compreende de uma quantidade terapeuticamente eficaz de a) um antagonista de BAFFR, por exemplo, um anticorpo da invenção, e b) pelo menos uma segunda substância selecionada de um fármaco imuno-supressor/imunomodulador, anti-inflamatório quimioterapêutico ou anti-infeccioso, por exemplo, como indicado acima. O *kit* pode compreender instruções para sua administração.

[000217] Onde os anticorpos da invenção são administrados em conjunto com outra terapia imuno-supressora/imunomoduladora, anti-inflamatória quimioterapêutica ou anti-infecciosa, as dosagens do composto de combinação coadministrado certamente variarão dependendo do tipo de cofármaco empregado, por exemplo, se for um DMARD, anti-TNF, bloqueador de IL-1 ou outros, no fármaco específico empregado, na condição sendo tratada e assim por diante.

[000218] Em uma modalidade específica, os anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação com outro agente de neutralização de célula B, isto é, por exemplo, um anticorpo alvejante de CD20 com atividade de ADCC, tal como Rituximab.

[000219] Em outra modalidade, os anticorpos da invenção são administrados somente à população paciente que é selecionada entre os pacientes que sofrem de SLE ou RA e exibindo um nível de soro anormal de BLYS. Em outra modalidade, os anticorpos da invenção são administrados somente à população paciente que é selecionada entre o grupo de pacientes que respondem ao tratamento anti-BLYS. Os biomarcadores que identificam os pacientes que têm uma probabilidade aumentada de responder ao tratamento anti-BLYS podem ser quaisquer dos seguintes sem estar limitados a estes: níveis elevados de BLYS do soro, níveis elevados de certos subgrupos de célula B, presença ou

ausência de certos tipos de auto-anticorpos.

[000220] Em uma modalidade, os anticorpos da invenção podem ser usados para detectar níveis BAFFR, ou níveis de células que contêm BAFFR. Isto pode ser obtido, por exemplo, contatando-se uma amostra (tal como uma amostra *in vitro*) e uma amostra de controle com o anticorpo anti-BAFFR sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e BAFFR. Qualquer complexo formado entre o anticorpo e BAFFR é detectado e comparado na amostra e no controle. Por exemplo, os métodos padrões de detecção, tais como ELISA e ensaios citométricos de fluxo, podem ser realizados usando as composições da invenção.

[000221] Consequentemente, em um aspecto, a invenção também fornece métodos para a detecção da presença de BAFFR (por exemplo, antígeno humano de BAFFR) em uma amostra, ou medindo-se a quantidade de BAFFR, que compreende contatar a amostra, e uma amostra de controle, com um anticorpo da invenção, ou uma região de ligação de antígeno dos mesmos, que especificamente se liga a BAFFR, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção dos mesmos e BAFFR. A formação de um complexo é então detectada, onde uma diferença na formação de complexo entre a amostra comparada com a amostra de controle é indicativa da presença de BAFFR na amostra.

[000222] Também no escopo da invenção estão kits consistindo em composições (por exemplo, anticorpos, anticorpos humanos e moléculas biespecíficas) da invenção e instruções para uso. O *kit* pode também conter pelo menos um reagente adicional, ou um ou mais anticorpos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo tendo uma atividade complementar que se liga a um epítipo no antígeno alvo distinto do primeiro anticorpo). Os kits tipicamente incluem um rótulo indicando o uso pretendido dos teores do kit. O termo rótulo inclui qualquer material

escrito ou registrado fornecido sobre ou com o kit, ou que de outro modo acompanhe o kit. O kit pode também compreender ferramentas para diagnosticar se um paciente pertence a um grupo que responde a um tratamento de anticorpo anti-BAFFR, como definido acima.

[000223] A invenção que foi completamente descrita, é também ilustrada pelos seguintes exemplos e reivindicações, que são ilustrativos e não são pretendidos serem também limitantes.

Breve Descrição das Figuras

[000224] Figura 1 mostra os resultados de artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos DBA/1 (MCOL37) após a imunização no dia 0, Reforço no dia 21, e Início do Tratamento menos 9 dias. O símbolo quadrado mostra as patas classificando quanto a Anti-BAFF Ab-MOR6743-mIgG2a com uma dose igual a 200 µg/200µl i.p. 2x por semana, (n=8). Os símbolos triângulos mostram as patas classificando quanto a um controle Anti CSA-IgG2a de isótipo com uma dose igual a 200 µg/200µl i.p. 2x por semana, (n=7). Estatísticas: Teste de comparação múltipla de Dunnett (ANOVA unidirecional). Comparado com o veículo de controle ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p > 0,05n.s.$).

[000225] Figura 2 mostra o número absoluto de células do sangue periférico CD20+ e CD40+ em 3 macacos cinomólogos após 20mg/kg de administração intravenosa de anticorpos anti-BAFFR (MOR06654).

[000226] Figura 3A mostra o número absoluto de células do sangue periférico CD20+ e CD40+ em 3 macacos cinomólogos após 20µg/kg de administração intravenosa de anticorpos anti-BAFFR (MOR06654).

[000227] Figura 3B mostra o número absoluto de células do sangue periférico CD20+ e CD40+ em 3 macacos cinomólogos após 20µg/kg de administração intravenosa de anticorpos anti-BAFFR não fucosilados (MOR06654).

Partes Experimentais

1. Ensaio de avaliação

Avaliação de FACS de Panículações Iniciais

[000228] Para a detecção de anticorpos de Fab de ligação de BAFFR a partir da primeira avaliação primária, por exemplo, avaliação de exibição de fago e/ou para o processo de avaliação secundário de clones positivos de ELISA, lisados de clones de *E. coli* selecionados podem ser avaliados em FACS como segue:

[000229] As células da respectiva linhagem celular (células parentais ou células transfectadas com BAFFR) são contadas e ajustadas para 2×10^7 células em PBS/3% de FCS/ 0,02% de NaN_3 (tampão de FACS). Em uma placa de fundo redondo de 96 cavidades, 2×10^5 células são misturadas com 35 μl de lisado bacteriano contendo Fab em um volume final de 100 μl de tampão de FACS e incubadas em um agitador a 4°C durante uma hora. As células são em seguida lavadas uma vez com tampão de FACS e re-suspensas em anticorpo secundário de IgG anti-humano de cabra conjugado por ficoeritrina que foi diluído 1:200 em tampão FACS. Após uma hora de incubação a 4°C em um agitador, as células foram novamente lavadas uma vez com o tampão de FACS, re-suspensas em tampão de FACS e a ligação de superfície celular é medida, por exemplo, através de intensidade de fluorescência das células no instrumento FACSArray (Becton Dickinson).

ELISA de Captura de Fc

[000230] Para identificar os anticorpos de Fab de ligação de BAFFR nos clones enriquecidos de exibição de fago, os lisados de clones de *E. coli* selecionados são avaliados em um ajuste de ELISA de captura de Fc como segue: placas de 384 cavidades Maxisorp são revestidas com 20 $\mu\text{g/ml}$ de Fc de IgG anti-humano de cabra diluído em PBS durante a noite a 4°C . No dia seguinte, as placas são lavadas, bloqueadas com 5% de MTBST, e incubadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de BAFFR:Fc (Alexis) durante uma hora em temperatura ambiente. Em paralelo, os lisados bacterianos contendo Fab são bloqueados com uma concentração final

de 2,5% de pó de leite. Em seguida, os lisados bacterianos pré-bloqueados são adicionados ao BAFFR:Fc capturado nas placas. Subsequentemente os Fabs de ligação de BAFFR:Fc são detectados por incubação com IgG anti-humano de cabra conjugado por alcalina fosfatase, Fab específico, diluído 1:5000 em 0,5% de MPBST, seguido por adição de substrato de fluorescência de AttoPhos (Roche Diagnostics). A emissão de fluorescência em 535 nm é registrada com excitação em 430 nm em uma leitora de placa TECAN Spectrafluor.

ELISA de Captura de Fab

[000231] Para a detecção de anticorpos de Fab de ligação de BAFFR de exibição de fago, os lisados de clones de *E. coli* selecionados são avaliados em um ajuste de ELISA de captura de Fab: as placas de 384 cavidades de Maxisorp são revestidas com um anticorpo específico de fragmento Fd, de IgG anti-humano de ovelha diluído 1:1000 em PBS durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas com TBS/ 0,05% de Tween/ 5% de pó de leite (5% de MTBST) durante uma hora em temperatura ambiente. Em paralelo, os lisados bacterianos contendo Fab são bloqueados com uma concentração final de 2,5% de pó de leite. Em seguida, os lisados bacterianos pré-bloqueados são adicionados ao anticorpo de captura imobilizado nas placas. Subsequentemente os fragmentos de HuCAL[®]-Fab capturados são permitidos se ligar a 1 µg/ml de BAFFR:Fc biotinilado (diluído em PBST) que é finalmente detectado por incubação com Estreptavidina conjugada para alcalina fosfatase (Zymax), diluído 1:3000 em 2,5% de MPBST, seguido por adição de substrato de fluorescência de AttoPhos (Roche Diagnostics). A emissão de fluorescência em 535 nm foi registrada com excitação em 430 nm em uma leitora de placa TECAN Spectrafluor.

ELISA de ligação de BAFFR – BLyS

[000232] Para diretamente identificar os anticorpos inibidores, Fabs

alvejados por FLAG são avaliados em um ELISA de ligação de BAFFR – BLyS: placas de 96 cavidades MaxiSorp são revestidas com 1 µg/ml de hsBLyS em PBS, durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas são lavadas e bloqueadas com PBS/ 2% de BSA durante pelo menos uma hora em temperatura ambiente. Em paralelo, os lisados bacterianos contendo Fab são bloqueados com uma concentração final de 2,5% de BSA. Os lisados bacterianos pré-bloqueados foram incubados com 5 µg/ml de anticorpo anti-FLAG M2 monoclonal durante 30 min para aumentar atividade inibidora por reticulação e subsequentemente 10 ng/ml de BAFFR:Fc biotilado (diluído em PBS/ 2% de BSA) são adicionados durante outros 30 min em temperatura ambiente, levemente agitando. A mistura de lisado pré-incubado/ bio-BAFFR:Fc é adicionada ao hsBLyS ligado a placa. Após 30 min em temperatura ambiente e lavagem, o bio-BAFFR:Fc ligado por BLyS é detectado por incubação com Estreptavidina conjugada para alcalina fosfatase (Zymax) diluída 1:3000 em PBS/ 2,5% de BSA, seguido por adição de substrato de fluorescência de AttoPhos (Roche Diagnostics). A emissão de fluorescência em 535 nm foi registrada com excitação em 430 nm em uma leitora de placa TECAN Spectrafluor.

[000233] No caso de Fabs purificado serem usados ao invés de lisados bacterianos, a etapa de reticulação anti-FLAG é omitida.

Avaliação de FACS após Maturação

Segunda Maturação:

[000234] Para a avaliação de ligadores da maturação a análise de FACS pode ser realizada como descrito com as seguintes alterações: o lisado dos clones de *E. coli* selecionados é diluído até que os sinais máximos estejam abaixo da saturação. Os lisados são analisados para ligação às células Raji. 5x10⁴ células por 96 cavidades são misturadas com 100 µl dos lisados bacterianos diluídos diferentes. A detecção dos Fabs ligados à célula é realizada como descrito. Os clones podem ser

ordenados de acordo com sua força de sinal.

2. Determinação de Afinidade de anticorpos identificados de ensaios de avaliação.

Método de Titulação de Equilíbrio de Solução (SET) para Determinação de K_D Usando BioVeris.

[000235] A determinação de afinidade na solução pode ser basicamente realizada como descrito na literatura (Friquet e outros (1985) J. Immunol. Meth. 77, 305-319 e Haenel e outros (2005) Anal. Biochem. 339, 182-184). Para melhorar a sensibilidade e precisão do método de SET, o método é transferido de ELISA clássica para ECL com base em tecnologia de BioVeris. 1 mg/ml de anticorpos específicos de fragmento de Fc, de IgG de anti-humano de cabra (Fab)₂ ou IgG de anti-camundongo de cabra (Dianova) foram rotulados com BV-tagTM NHS-Ester (Bioveris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) de acordo com as instruções do fabricante. O experimento é realizado em placas de microtítulo de polipropileno e PBS pH 7,4 suplementadas com 0,5% de BSA e 0,02% de Tween 20 como tampão de ensaio. BAFFR:Fc não rotulado é diluído em séries 2n. As cavidades sem antígeno foram usadas para determinar os valores de S_{max}. Após a adição de 100 de pM Fab (concentração final em 75 µl de volume final), a mistura foi incubada durante 2 horas em Temperatura Ambiente. Subsequentemente uma mistura de 25 µl de Dynabeads (0,4 mg/ml de Estreptavidina M-280, DYNAL, Hamburg), revestida com 0,25 µg/ml de antígeno de BAFFR:Fc biotinilado e anticorpo de detecção rotulado por BV-rótulo em uma diluição final de 1:4000 para Fab anti-humano ou 1:2000 para IgG anti-camundongo foram adicionados por cavidade. Após a incubação durante 30 minutos em um agitador Eppendorf (700 rpm) em RT, os sinais de eletroquimioluminescência são detectados usando uma Estação de Trabalho M-384 SERIES® (Bioveris Europe).

Determinação de K_D Biacore em Antígeno Diretamente Revestido

[000236] As constantes cinéticas k_{on} e k_{off} são determinadas com diluições em série da respectiva ligação de Fab a BAFFR:Fc capturado por Fc ou a BAFFR:Fc (Alexis) covalentemente imobilizado ou BAFFR (Peprotech) usando o instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suécia). Para imobilização covalente dos antígenos ou do anticorpo de captura anti-Fc, substância química de acoplamento de amina de EDC-NHS padrão é usada. As medições de cinéticos foram feitas em PBS (NaCl a 136 mM, KCl a 2,7 mM, Na_2HPO_4 a 10 mM, KH_2PO_4 a 1,76 mM pH 7,4) em uma taxa de fluxo de 20 μ l/min usando concentrações de Fab variando de 1,5 a 500 nM. O tempo de injeção para cada concentração é 1 min, seguido por 3 ou 15 min de fase de dissociação. Para a regeneração, duas injeções de Glicina/HCl pH 1,5 são aplicadas. Todos os sensogramas são ajustados usando o software de avaliação BIA 3.1 (Biacore).

[000237] Para determinação da afinidade na presença de 10% de soro humano a medição de cinético é realizada em PBS contendo 10% de soro humano que foi filtrado estéril (tamanho de poro 1,2 e 0,2 μ m) antes do uso para remover os agregados de proteína após descongelamento.

Determinação de Valores de IC_{50} no Ensaio de Ligação de BAFFR – BLyS (Competição FACS)

[000238] O ensaio de ligação de BAFFR – BLyS é realizado usando as células Raji expressando BAFFR endógeno. Os Fabs específicos de BAFFR são usados em diluições finais variando de 40 a 0,001 nM. Os Fabs diluídos são incubados em placas de 96 cavidades com 5×10^4 células Raji por cavidade durante 1 h a 4°C em um agitador. Em seguida hsBLyS biotinilado é adicionado em uma concentração final de 25 ng/ml e as células foram incubadas durante 30 min a 4°C em um agitador. As células são lavadas duas vezes com tampão de FACS e em seguida re-suspensas em Estreptavidina conjugada por ficoeritrina (Dianova) que foi diluída 1:200 em Tampão de FACS. O manchamento

é realizado durante uma hora a 4°C em um agitador. Finalmente as células são lavadas duas vezes com Tampão de FACS, re-suspensas em Tampão de FACS e a ligação de BLyS ao BAFFR de superfície celular é detectada através de citometria de fluorescência no instrumento FACSArray (Becton Dickinson).

Determinação de Valores de IC₅₀ no Ensaio de Ligação de BAFFR:Fc – BLyS (ELISA de Competição)

[000239] As placas de 96 cavidades MaxiSorp são revestidas durante a noite a 4°C com BLyS solúvel humano. Após o revestimento, as cavidades foram lavadas 4 vezes com PBS/0,05% de Tween20 (PBST) e em seguida bloqueadas durante 1 h a 37°C com PBST contendo 1% de albumina de soro bovino seguido por 4 etapas de lavagem com PBST. BAFFR humano biotinilado:proteína de fusão de Fc (Axxora) em 20ng/ml foi adicionado e capturado durante 1 h a 37°C junto com concentrações crescentes de anticorpos anti-BAFFR. Após outra rodada de lavagem, ExtrAvidin-Alcalina Fosfatase (Sigma) foi adicionada às cavidades e incubada durante 30 minutos a 37°C. A fosfatase ligada foi detectada adicionando-se uma solução contendo p-nitrofenilfosfato em dietanolamina (Sigma). A reação colorida foi para após aproximadamente 20 minutos com um volume igual de hidróxido de sódio a 2N e a absorvência foi medida em 405 nm em uma leitora de placa (SpectraMax 190, Molecular Devices).

Determinação de Valores de IC₅₀ no Ensaio de Ligação de peptídeo de BAFFR (miniBR3) – BLyS (ELISA de Competição)

[000240] As placas de 96 cavidades MaxiSorp foram revestidas durante a noite a 4°C com BLyS solúvel humano. Após o revestimento, as cavidades foram lavadas 4 vezes com PBS/0,05% de Tween20 (PBST) e em seguida bloqueadas durante 1 h a 37°C com PBST contendo 1% de albumina de soro bovino seguido por 4 etapas de lavagem com PBST. O peptídeo derivado de BAFFR biotinilado

(miniBR3, PiCHEM, Áustria) em 20ng/ml foi adicionado e capturado durante 1 h a 37°C junto com concentrações crescentes de anticorpos anti-BAFFR. Após outra rodada de lavagem, ExtrAvidin-Alcalina Fosfatase (Sigma) foi adicionada às cavidades e incubada durante 30 minutos a 37°C. A fosfatase ligada foi detectada adicionando-se uma solução contendo p-nitrofenilfosfato em dietanolamina (Sigma). A reação colorida foi parada após aproximadamente 20 minutos com um volume igual de hidróxido de sódio a 2N e a absorção foi medida a 405 nm em uma leitora de placa (SpectraMax 190, Molecular Devices).

Análise de Reatividade Cruzada para BAFFR Cinomólogo

[000241] A reatividade cruzada dos Fabs para BAFFR de cinomólogo é testada em análise e titulação de FACS em células HEK293T transfectadas com BAFFR. Os Fabs candidatos finais são usados em diluições que variam de 177 nM a 0,001 nM. Os Fabs diluídos são incubados em placas de 96 cavidades com 5×10^4 células por cavidade durante 1 h a 4°C em um agitador. Em seguida as células são lavadas duas vezes com tampão de FACS e re-suspensas em IgG anti-humano de cabra conjugado por ficoeritrina (Dianova) que foi diluído 1:200 em tampão de FACS. O manchamento é realizado durante 1 h a 4°C em um agitador. Finalmente, as células são lavadas duas vezes com tampão de FACS e a ligação de Fab é detectada através de citometria de fluorescência no instrumento FACSArray (Becton Dickinson).

Análise de reatividade cruzada com BCMA e TACI

FACS

[000242] A reatividade cruzada dos Fabs para BCMA é testada na análise de titulação de FACS em células HEK293T transfectadas com BCMA: os Fabs são usados em concentrações finais variando de nM elevado ou ainda μ M até pM. O manchamento das células e a detecção de ligação de Fab são realizados como descrito.

Elisa

[000243] As placas de 384 cavidades MaxiSorp são revestidas durante a noite a 4°C com um anticorpo de captura específico de fragmento Fc γ , de IgG anti-humano de cabra. Após o revestimento as cavidades foram lavadas duas vezes com PBS/0,05% de Tween20 (PBST) e em seguida bloqueadas durante 1 h a RT com PBST contendo 5% de pó de leite seguido por duas etapas de lavagem com PBST. BCMA recombinante e proteínas de Fc-fusão de TACI são adicionadas e capturadas durante 1 h em RT. Em seguida os Fabs purificados e Fabs específicos de BAFFR diluídos são adicionados e as placas são incubadas durante 1 h em RT. Para detectar os Fabs, um Fab específico de IgG anti-humano de cabra conjugado por alcalina fosfatase (AP) é adicionado e as placas são incubadas durante 1 h em RT. Em seguida a cada etapa de incubação as cavidades são lavadas cinco vezes com PBST. Para a detecção dos conjugados por AP, AttoPhos (Roche) é usado de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência é medida usando uma leitora de placa TECAN Spectrafluor.

3. Ensaios funcionais com base em célula

Coestimulação induzida por BLyS de proliferação de célula B humana

[000244] B-linfócitos não tocados foram purificados de células mononucleares do sangue periférico por depleção de outros tipos de célula usando o *kit* II de isolamento de célula B MACS (Miltenyi Biotec). Para induzir a proliferação de célula B, 100 μ l contendo 1×10^5 células foram semeados em placas de 96 cavidades de fundo redondo em cinco replicações. O BLyS solúvel humano foi adicionado em uma concentração de 3ng/ml junto com 0,35% (vol/vol) de contas acopladas com anticorpos anti-humano de IgM. Para determinar suas potências inibidoras, os anticorpos anti-BAFFR em diferentes concentrações foram adicionados em diferentes concentrações. Para a determinação

de propriedades agonísticas de anticorpos anti-BAFFRs, as células foram induzidas com 0,35% (vol/vol) de contas acopladas com anticorpos de IgM anti-humano e concentrações crescentes de anticorpos anti-BAFFR (nenhum BLYS adicional adicionado). Posteriormente, as células foram cultivadas durante 3 dias. Durante as últimas 12 horas, 1µCi/cavidade de timidina titulada foi adicionado. As células foram colhidas em um filtro e a radioatividade associada a célula foi quantificada em um contador de cintilação.

Coestimulação induzida por BLYS de Produção de IgG1 de Célula B Humana

[000245] B-linfócitos não tocados foram purificados de células mononucleares do sangue periférico por depleção de outros tipos de célula usando o *kit* II de isolamento de célula B MACS (Miltenyi Biotec). Para induzir a síntese de IgG1, 100µl contendo 1×10^5 células foram semeados em placas de 96 cavidades de fundo redondo em cinco replicações e estimuladas com 3ng/ml de BLYS solúvel humano junto com 100 ng/mL de IL-21 humana (Pepro Tech Inc.). Para determinar suas potências inibidoras, os anticorpos anti-BAFFR foram adicionados em diferentes concentrações. Para a determinação de propriedades agonísticas de anticorpos anti-BAFFR, as células foram induzidas com 100 ng/mL de IL-21 humana e concentrações crescentes de anticorpos anti-BAFFR (nenhum BLYS adicional adicionado). As células foram cultivadas durante 9 dias e os sobrenadantes foram coletados. IgG1 foi determinado nos sobrenadantes celulares por ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA).

Ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)

[000246] Os B-linfócitos não tocados foram purificados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por depleção de outros tipos de célula usando o *kit* II de isolamento de célula B de MACS (Miltenyi Biotec). Similarmente, as células exterminadoras naturais

autólogas (NK) foram purificadas de PBMC por depleção negativa em um dispositivo AutoMAC usando o kit de isolamento de célula NH humana de MACS (Milteny Biotech). As concentrações crescentes de anticorpos anti-BAFFRs em 100µl foram incubadas com 1×10^4 de células B em 50µl de meio de cultura em placas de 96 cavidades em forma de V (Corning) durante 20 minutos. Em seguida, 50µl contendo 1×10^5 células NK foram adicionados e incubados durante 4 horas a 37°C. As células foram centrifugadas e 150µl de sobrenadante foi removido. As células foram re-suspensas e 10µl de uma diluição de 1:100 de 7-amino actinomicina D (7-AAD, Becton Dickinson) foi adicionada. As células foram enumeradas em um instrumento FACScalibur (Becton Dickinson). A análise de dados de células positivas 7-AAD foi realizada usando o software CellQuest Pro (Becton Dickinson).

4. Ensaios Funcionais *In vivo*

Ensaio de depleção de célula B In vivo

[000247] Os efeitos de depleção de anticorpos anti-BAFFR em números de célula B são avaliados como segue:

a) Números relativos de células B no compartimento de linfócito de sangue são medidos por manchamento de sangue total ou células mononucleares do sangue periférico isoladas (PBMC) com anticorpos específicos rotulados fluorescentes para marcadores de superfície de célula B e célula T (CD3 e CD19, respectivamente). A porcentagem relativa de células positivas CD3 e CD19 é quantificada por citometria de fluxo e uma redução seletiva de célula B pode ser expressa por um aumento na relação de células T para células B.

b) Números absolutos de célula B são determinados como células/microtítulo de sangue por citometria de fluxo usando anticorpo anti-CD19 rotulado fluorescente em combinação com tubos TruCOUNT (No. de Catálogo 340334; Becton Dickinson, San Jose CA) de acordo

com as instruções do fabricante.

Ensaio de modelo animal CIA

[000248] Artrite induzida por colágeno (CIA) foi proposta refletir muitos aspectos da doença humana. CIA é induzido por imunização de cepas geneticamente susceptíveis de camundongos com colágeno tipo II em adjuvante e é mediada por reações autoimunes incluindo geração de auto-anticorpo, que em seguida se liga a uma região particular de colágeno tipo II (CII). Ambos os linfócitos B e T são importantes na patogênese de CIA. A histologia de articulação no modelo animal tem muitas similaridades com a doença humana com aspectos tais como hiperplasia sinovial, erosão marginal e destruição da superfície de cartilagem sendo algumas das características da patofisiologia.

[000249] Após a imunização com colágeno tipo II (C-II) no dia 0 e tratamento de reforço subsequente com C-II no dia 21, os camundongos DBA/1 geralmente desenvolveram sintomas de artrite. No estudo presente, os camundongos são tratados intraperitonealmente, duas vezes por semana com 200 ug por camundongo de anticorpos anti BAFFR ou anticorpos de controle de isótipo em um regime profilático (menos 10 dias a aproximadamente dia 36). O inchaço da pata é monitorado durante todo o experimento como um indicador da severidade da doença. A histologia é realizada nas patas no final do experimento se a eficácia de inchaço for observada. A depleção de célula B no baço, linfonodos e sangue pode ser avaliada por isolamento de célula e análise de FACS. ELISA para anticorpos anticolágeno é realizada para investigar se o título de anticorpo também é suprimido. Os anticorpos são presumidos terem boa eficácia em um modelo de animal CIA se eles exibem uma redução estatisticamente significativa no inchaço quando um teste de comparação múltiplo de Dunnett (ANOVA unidirecional) foi aplicado. Geralmente isto traslada para uma redução de 50% no inchaço da pata durante o curso de tempo com

baixa variação entre os animais em cada grupo.

Exemplos:

[000250] A seguinte tabela descreve os números de SEQ ID para os CDRs correspondentes de exemplos específicos de anticorpos da invenção. As cepas HCDR1, HCDR2 e HCDR3 para o CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de um anticorpo e cepas LCDR1, LCDR2 e LCDR3 para o CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de um anticorpo.

Nº. de mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR06743	NO:2	NO:9	NO:16	NO:23	NO:30	NO:37
MOR06654	NO:3	NO:10	NO:17	NO:24	NO:31	NO:38
MOR07342	NO:4	NO:11	NO:18	NO:25	NO:32	NO:39
MOR07347	NO:5	NO:12	NO:19	NO:26	NO:33	NO:40
MOR07348	NO:6	NO:13	NO:20	NO:27	NO:34	NO:41
MOR07349	NO:7	NO:14	NO:21	NO:28	NO:35	NO:42

Tabela 1: No. de mAb de correspondência e SEQ IDs

Caracterização Detalhada dos exemplos

Determinação do EC₅₀ dos anticorpos da invenção em um formato Fab humano em FACS

[000251] O EC₅₀ dos Fabs é determinado por titulação de Fab em FACS em células HEK293 transfectadas como também em células Raji expressando BAFFR endógeno.

MOR0	EC ₅₀ [nM] em células Raji	EC ₅₀ [nM] em HEK293-hBAFFR
6654	0,12 / 0,32 / 0,44 / 0,51	0,98 / 0,25
6743	0,23 / 0,18	0,59 / 0,27
7342	0,06	0,18
7347	0,03 / 0,06 / 0,18	0,08
7348	0,12	0,24
7349	0,13	0,24

Tabela 2: EC₅₀ de anticorpos Fab em células Raji e HEK293-hBAFFR transfectado

[000252] Uma vez que Glutamina encontrada em MOR07347 na posição 110 em HCDR3 parece ser vantajosa, esta posição é também introduzida no clone cruzado MOR6743 resultando no anticorpo MOR07685. Este anticorpo mostra um valor de EC_{50} determinado em titulação de FACS que é comparável com aqueles de MOR06743 e MOR07347.

Determinação de valores de IC_{50} dos Fabs em ensaio de ligação de BAFFR – BLyS (FACS)

[000253] Os valores de IC_{50} dos anticorpos da invenção em um formato de Fab humano são determinados em um ensaio de inibição de ligação de BAFFR por titulação de Fab em células Raji (FACS). Os resultados destas análises são listados na Tabela 3.

MOR0	IC_{50} [nM]
6654	0,09 / 0,37 / 0,30 / 0,16
6743	0,13 / 0,17
7342	0,09
7347	0,02
7348	0,20
7349	0,17
7685	0,12

Tabela 3: Valores de IC_{50} para inibição de ligação de BAFFR–BLyS em um formato de formato de Fab humano em células Raji

Determinação de valores de IC_{50} dos anticorpos em ensaios de ligação de BAFFR – BLyS (ELISA)

[000254] Os valores de IC_{50} dos anticorpos da invenção em um formato de IgG2 e Fab humano são determinados em um ELISA competitivo nos quais os anticorpos são titulados para inibir a interação entre o domínio extracelular de BAFFR (proteína de fusão de BAFFR:Fc) e BLyS solúvel humano. Os valores de IC_{50} foram também determinados em um ELISA competitivo similar no qual os anticorpos da invenção

foram titulados para inibir a ligação de um peptídeo derivado de BAFFR (miniBR3) ao ensaio de BLys humano.

Os resultados destas análises são listados na Tabela 4.

MOR0	IC ₅₀ de ELISA de competição de BLyS/BAFFR:Fc [nM]		IC ₅₀ de ELISA de competição de peptídeo de BLyS/BAFFR [nM]
	Hu Fab	Hu IgG2	Hu IgG2
6654	1,1	0,024	5,9
6743	0,1	0,034	3,5
7342	0,14	n.d.	n.d.
7347	0,1	0,019	n.d.
7348	0,96	n.d.	n.d.
7349	0,44	0,05	n.d.

Tabela 4: Valores de IC₅₀ para inibição de ligação de BAFFR – BLyS em um formato de IgG2 humano

Análise de reatividade cruzada com BCMA e TACI

[000255] BCMA e TACI são proteínas que estão relacionadas com BAFFR e podem também ligar o BLyS ligante. Os Fabs são testados quanto a reatividade cruzada não desejada com estas duas proteínas. A reatividade dos aglutinantes a BCMA é testada em proteína recombinante em ELISA e em antígeno de superfície de célula em análise FACS.

[000256] Em ELISA os Fabs são titulados de 400 nM até 0,005 nM em BAFFR:Fc capturado por uma placa Maxisorp através de um anticorpo Fc anti-human. Somente MOR07342 e MOR07346 mostra alguma reatividade cruzada com BCMA em concentrações de Fab elevadas >100 nM. Em contraste MOR06654, MOR07347, MOR07348, MOR07349 mostram nenhuma ligação ao BCMA acima da base. Um fator de discriminação de 1000 vezes é alcançado por todos os Fabs.

[000257] Em FACS os seguintes Fabs são analisados em células HEK293 transfectadas por BCMA e titulados de 1 µM até 0,005 nM:

MOR06654, MOR06743, MOR07342, MOR07347, MOR7348 e MOR07349. Em 330 nM somente MOR07342 mostra um sinal de ligação elevado que é 2 vezes acima da base. Todos os outros Fabs testados mostram nenhum sinal nesta concentração. Em uma concentração de Fab de 1 μ M MOR06654, MOR06743 e MOR07347 mostraram sinais 3-4 vezes acima da base. MOR07342 mostra ligação às células transfectadas com BCMA com um sinal 20 vezes acima da base. MOR007348 e MOR07349 não se ligam a BCMA até uma concentração de Fab de 1 μ M.

Potência de anticorpos da invenção em ensaios de célula B funcionais

Potência e agonismo de anticorpos no ensaio de proliferação de célula B coestimulador mediado por BLyS

[000258] As células B derivadas de sangue humano primárias são estimuladas com anticorpos anti-IgM e BLyS solúvel humano a induzir a proliferação de célula B. Os anticorpos da invenção são titulados para bloquear o efeito co-estimulador de BLyS. Para medir os efeitos agonísticos c (isto é, semelhante a BLyS) dos anticorpos, as células B são estimuladas com os anticorpos anti-IgM sozinhos. Os anticorpos de BAFFR são titulados para medir um realce potencial de proliferação de célula B. Os resultados destas análises são mostrados na Tabela 5 para diferentes formatos de anticorpo de BAFFR (Fab, IgG2 e IgG1 humanos).

formato	MOR0	Proliferação de célula B	
		IC ₅₀ de Inibição [nM]	EC ₅₀ de agonismo [nM]
Fab	6654	16	>187
Fab	6743	2	>187
Fab	7342	0,9	>187
Fab	7347	1,3	>187
Fab	7348	2,9	>187

Fab	7349	3,5	>187
IgG2	6654	0,084	>187
IgG2	6743	0,032	>187
IgG2	7342	0,041	>187
IgG2	7347	0,043	>187
IgG2	7348	0,079	>187
IgG2	7349	0,072	>187
IgG1	6654	0,122	>187
IgG1	7342	0,031	>187
IgG1	7347	0,034	>187
IgG1	7349	0,079	>187

Tabela 5: atividade antagonística e agonística de anticorpos da invenção em um formato Fab, IgG2 e IgG1

Potência e agonismo de anticorpos no ensaio de produção de IgG1 de célula B co-estimuladora mediado por BLYS

[000259] As células B derivadas de sangue humano primárias são estimuladas com IL-21 e BLYS solúvel humano a induzir a produção de IgG1. Os anticorpos da invenção são titulados para bloquear o efeito co-estimulador de BLYS. Para medir os efeitos agonísticos (isto é, semelhante a BLYS) dos anticorpos, as células B são estimuladas com IL-21 sozinho. Os anticorpos anti-BAFFR são titulados para medir um realce potencial de secreção de IgG1. Os resultados destas análises são mostrados na Tabela 6.

formato	MOR0	Produção de IgG1 de célula B	
		IC ₅₀ de inibição [nM]	EC ₅₀ de Agonismo [nM]
IgG2	6654	0,028	>62,5
IgG2	6743	0,018	>62,5
IgG2	7342	0,023	>62,5
IgG2	7347	0,024	>62,5
IgG2	7348	0,088	>62,5
IgG2	7349	0,039	>62,5

Tabela 6: IC₅₀ de Produção de IgG1 de Célula B***Potência dos anticorpos para provocar a morte de célula B no ensaio de ADCC***

[000260] Os anticorpos anti-BAFFR em concentrações crescentes são permitidos se ligarem às células B derivadas de sangue humano primárias antes que as células exterminadoras naturais(NK) autólogas sejam adicionadas para induzir a reação de exterminação. Após quatro horas, o número de células apoptóticas é enumerado por FACS. Os resultados destas análises são mostrados na Tabela 7 para formatos de anticorpo IgG1 e IgG2.

formato	MOR0	ADCC
		EC ₅₀ [nM]
IgG2	6654	>63
IgG2	7342	>63
IgG1	6654	0,186
IgG1	7342	0,195

Tabela 7: EC₅₀ mostrando a atividade de exterminação de célula B de anticorpos da invenção no formato de IgG1 e IgG2

Exemplo 2: Eficácia *in vivo* em um modelo e camundongo de CIA

[000261] Os camundongos foram tratados com 200 ug/animal de anti anticorpo BAFFR (conjugado para camundongos IgG2a) ou anticorpo de controle de isótipo 9, 6 e 2 dias antes da imunização com colágeno tipo 2 bovino em adjuvantes de Freund's completo. Os anticorpos foram aplicados em 200ug/camundongo duas vezes por semana, durante todo o experimento (até o dia 35 após a imunização). Os camundongos foram reforçados com colágeno tipo 2 bovino em salina tamponada por fosfato, 21 dias após a imunização. O inchaço foi avaliado a cada 2 a 3 dias a partir do dia do reforço em diante. Como mostrado na figura 1, o anticorpo anti BAFFR significativamente reduziu o inchaço quando comparado com o seu anticorpo anti CSA de controle.

Exemplo 3: Depleção de células B periféricas em macacos cinomólogos

[000262] Os macacos cinomólogos foram tratados com 4 doses semanais de 20 mg/kg i.v. do anticorpo monoclonal BAFF-R anti-humano MOR06654 (IgG1/k). Os números de células B no sangue foram determinados em diferentes pontos de tempo pré-dose e pós-dose por análise de FACS. Em resumo, as amostras de sangue foram incubadas com anticorpo anti-CD20 rotuladas por fluorescência (Anti-humano CD20-PE, Clone 2H7, BD, No. do catálogo 555623) ou anticorpo anti-CD40 (Anti-humano CD40-APC, Clone 5C3 BD, No. do catálogo 555591) em tubos True Count (BD, No. do catálogo 340334). Os resultados são mostrados na figura 2.

[000263] As células B foram rapidamente depauperadas em macacos tratados até uma média de 33% do número de célula B de pré-dose (n=3). A redução de células B permaneceu ou aumentou com doses subsequentes. A média de redução de célula B foi 85% (n=3) no dia 56, isto é, 45 dias após a última dose. Um aumento gradual do número de células B foi observado após o dia 56.

[000264] Em conclusão, o tratamento com o anticorpo anti-BAFF- R humano leva a uma redução rápida e prolongada em células B periféricas em macacos cinomólogos y. Este efeito farmacodinâmico é reversível, permite a restauração da homeostasia de célula B normal após a eliminação do anticorpo da circulação.

Exemplo 4: Depleção de célula B mais forte e mais prolongada com anticorpos não fucosilados

[000265] Em um Segundo experimento, os macacos cinomólogos foram tratados com uma dose única de MOR06654 (IgG1) ou o variante não fucosilado MOR06654B. MOR06654B foi produzido usando as linhagens celulares Potelligent™ (Biowa, Inc.). Estas linhagens celulares são linhagens celulares de mamífero CHO, nocauteadas pelo

gene codificando fucosiltransferase. Os anticorpos (MOR06654B) produzidos em tais linhagens celulares não são fucosilados. Este tempo, a dose única foi somente 20 µg/kg i.v.

[000266] Como mostrado na figura 3, uma redução marginal, porém observável de células B por tratamento com 20 µg/kg i.v. de MOR06654 foi observada no dia 7 (redução média de 22%, n=3). A diminuição na célula B periférica foi mais pronunciada e mais prolongada para o anticorpo MOR06654B, em necessidade de fucose. Aqui a redução alcançou 57% (n=3) e é ainda cerca de 40% (n=3) 28 dias após a dose única.

Exemplo 5: Avaliação de anticorpos que bloqueiam cruzado anticorpos de ligação de BAFFR da presente invenção

Ensaio de bloqueio cruzado Biacore

[000267] O seguinte geralmente descreve um ensaio Biacore adequado para determinar se um anticorpo ou outro agente de ligação bloqueia cruzado ou é capaz de bloquear cruzado os anticorpos de acordo com a invenção. Será apreciado que o ensaio possa ser usado com quaisquer dos agentes de ligação de BAFFR descritos aqui.

[000268] A máquina de Biacore (por exemplo, a BIAcore 3000) é operada em linha com as recomendações do fabricante.

[000269] BAFFR pode ser acoplado a, por exemplo, um chip CM5 Biacore por meio de substância química de acoplamento de amina rotineiramente usada, por exemplo, acoplamento de amina por EDC-NHS, para criar uma superfície revestida por BAFFR. Para obter níveis mensuráveis de ligação, tipicamente 200-800 unidades de ressonância de BAFFR podem ser acopladas ao chip (esta quantidade determina os níveis mensuráveis de ligação e ao mesmo tempo facilmente saturáveis pelas concentrações de reagente de teste sendo usado).

[000270] Um modo alternativo de prender BAFFR ao chip BIAcore é utilizando-se uma versão de BAFFR "rotulado", por exemplo, BAFFR

rotulado por His de terminal de N ou terminal de C. Neste formato, um anticorpo anti-His seria acoplado ao chip Biacore e em seguida o BAFFR rotulado por His seria passado sobre a superfície do chip e capturado pelo anticorpo anti-His.

[000271] Os dois anticorpos a serem avaliados quanto à sua capacidade de bloquear cruzado cada outro são misturados em uma quantidade estoquiométrica, por exemplo, em uma relação molar de um para um, de sítios de ligação em um tampão adequado para criar a mistura de teste. O tampão usado é tipicamente um tampão que é normalmente usado na química de proteína, tal como, por exemplo, PBS (NaCl a 136 mM, KCl a 2,7 mM, Na_2HPO_4 a 10 mM, KH_2PO_4 a 1,76 mM, pH 7,4). Ao calcular as concentrações em uma base de sítio de ligação o peso molecular de um anticorpo é assumido ser o peso molecular total do anticorpo dividido pelo número de sítios de ligação alvo (isto é BAFFR) naquele anticorpo.

[000272] A concentração de cada anticorpo na mistura de teste deve ser elevada o suficiente para garantir a saturação dos sítios de ligação para aquele anticorpo nas moléculas de BAFFR que são ligadas no chip BIAcore. Os anticorpos na estão na mesma concentração molar (em uma base de ligação) e tal concentração tipicamente seria entre 1,0mM e 1,5mM (em uma base de sítio de ligação).

[000273] As soluções separadas contendo os anticorpos separados neles mesmos são também preparadas. O tampão usado para estas soluções separadas deve ser o mesmo tampão e na mesma concentração como foi usado para a mistura de teste.

[000274] A mistura de teste é passada sobre o chip BIAcore revestido por BAFFR e a ligação foi registrada. Os anticorpos ligados são por conseguinte removidos tratando-se o chip com, por exemplo, um ácido, tal como HCl a 30mM durante cerca de 1 minuto. É importante que as moléculas de BAFFR que estão ligadas ao chip não sejam danificadas.

[000275] A solução do primeiro anticorpo sozinho é então passada sobre a superfície revestida com BAFFR e a ligação é registrada. Por conseguinte, o chip é tratado para remover todo o anticorpo ligado sem danificar o BAFFR ligado ao chip, por exemplo, através do tratamento de ácido mencionado acima.

[000276] A solução do segundo anticorpo sozinho é então passada sobre a superfície revestida por BAFFR e a quantidade de ligação é registrada.

[000277] A ligação teórica máxima pode ser definida como a soma da ligação ao BAFFR de cada anticorpo separadamente. Isto é então comparado com a ligação atual da mistura de anticorpos medidos. Se a ligação atual é menor do que aquela da ligação teórica, os dois anticorpos ficam bloqueando cruzado cada outro.

Ensaio de bloqueio cruzado com base em Elisa

[000278] O bloqueio cruzado de um anticorpo anti-BAFFR ou outro agente de ligação de BAFFR pode ser também detectado utilizando-se um ensaio ELISA.

[000279] O princípio geral do ensaio de ELISA envolve o revestimento de um anticorpo anti-BAFFR sobre as cavidades de uma placa ELISA. Uma quantidade em excesso de um segundo anticorpo anti-BAFFR potencialmente bloqueado cruzado, é então adicionada na solução (isto é, não ligado à placa ELISA). Uma quantidade limitada de BAFFR-Fc é então adicionada às cavidades.

[000280] O anticorpo que é revestido sobre as cavidades e o anticorpo na solução competirão para a ligação do número limitado de moléculas de BAFFR. A placa é então lavada para remover BAFFR-Fc que foi ligado ao anticorpo revestido e para também remover o segundo anticorpo de fase de solução como também qualquer complexo formado entre o segundo anticorpo de fase de solução e o BAFFR-Fc. A quantidade de BAFFR ligado é então medida usando um reagente de

detecção de BAFFR apropriado. Um anticorpo na solução que é capaz de bloquear cruzado o anticorpo cruzado será capaz de causar uma diminuição no número de moléculas de BAFFR que o anticorpo revestido pode ligar relativo ao número de moléculas de BAFFR que o anticorpo revestido pode ligar na ausência do segundo anticorpo, de fase de solução.

[000281] Este ensaio está descrito em mais detalhes também abaixo para os dois anticorpos chamados Ab-X e Ab-Y. No caso onde Ab-X é escolhido ser o anticorpo imobilizado, ele é revestido sobre as cavidades da placa ELISA, após o que as placas são bloqueadas com uma solução de bloqueio adequada para minimizar a ligação não específica de reagentes que são subsequentemente adicionados. Uma quantidade em excesso de Ab-Y é então adicionada a placa ELISA tal que os mols de sítios de ligação de Ab-Y BAFFR por cavidade sejam pelo menos 10 vezes mais elevados do que os mols dos sítios de ligação de Ab-X BAFFR que foram usados, por cavidade, durante o revestimento da placa de ELISA. BAFFR-Fc é então adicionado tal que os mols de BAFFR-Fc adicionado por cavidade sejam pelo menos 25 vezes menores do que os mols dos sítios de ligação de Ab-X BAFFR que foram usados para revestir cada cavidade. Em seguida a um período de incubação adequado, a placa de ELISA é lavada e um reagente de detecção de BAFFR é adicionado para medir a quantidade de BAFFR especificamente ligado pelo anticorpo anti-BAFFR revestido (neste caso Ab-X). O sinal de base para o ensaio é definido como o sinal obtido nas cavidades com o anticorpo revestido (neste caso Ab-X), o segundo anticorpo de fase de solução (neste caso Ab-Y), tampão de BAFFR somente (isto é no BAFFR) e reagentes de detecção de BAFFR. O sinal de controle positivo para o ensaio é definido como o sinal obtido nas cavidades com o anticorpo revestido (neste caso Ab-X), tampão do segundo anticorpo de fase de solução somente (isto é no segundo

anticorpo de fase de solução), BAFFR e reagentes de detecção de BAFFR. O ensaio de ELISA necessita ser realizado de uma tal maneira de modo que o sinal de controle positivo seja pelo menos 6 vezes o sinal de base.

[000282] Para evitar qualquer artefato (por exemplo, afinidades significativamente diferentes entre Ab-X e Ab-Y para BAFFR) resultantes da escolha daquele anticorpo para usar como o anticorpo de revestimento e que para usar como o segundo (competidor) anticorpo, o ensaio de bloqueio cruzado necessita ser realizado em dois formatos: 1) formato 1 é onde Ab-X é o anticorpo que é revestido sobre a placa de ELISA e Ab-Y é o anticorpo competidor que está na solução e 2) formato 2 é onde Ab-Y é o anticorpo que está revestido sobre a placa ELISA e Ab-X é o anticorpo competidor que está na solução.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou proteína funcional compreendendo uma porção de ligação ao antígeno de um anticorpo a um polipeptídeo alvo BAFFR (SEQ ID NO: 87), caracterizado por o anticorpo ou proteína funcional compreende:

(a) uma sequência de aminoácidos de CDR1 da região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO: 3;

(b) uma sequência de aminoácidos de CDR2 da região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO: 10;

(c) uma sequência de aminoácidos de CDR3 da região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO: 17;

(d) uma sequência de aminoácidos de CDR1 da região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 24;

(e) uma sequência de aminoácidos de CDR2 da região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 31; e

(f) uma sequência de aminoácidos de CDR3 da região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 38;

e em que o referido anticorpo ou proteína funcional se liga ao polipeptídeo BAFFR com um K_D de 100 nM ou menos e inibe a proliferação de células B humanas induzida BLyS com um IC_{50} de 10 nM ou menos e esgota células B *in vivo* ou *in vitro*.

2. Anticorpo ou proteína funcional de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de polipeptídeo de V_H de SEQ ID NO: 52 e uma sequência de polipeptídeo de V_L de SEQ ID NO: 45.

3. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada de comprimento total compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 e uma cadeia leve de comprimento total compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

4. Anticorpo isolado ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de que esgota células B *in vitro* com um EC₅₀ de 10nM ou menos, conforme medido em um ensaio ADCC depleção de células B humanas.

5. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo IgG1 totalmente humano ou humanizado.

6. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende uma região Fc com aminoácidos mutados ou quimicamente modificada, em que a referida região Fc mutada ou quimicamente modificada fornece atividade ADCC aumentada quando comparada com a região Fc do tipo selvagem.

7. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o referido anticorpo ou proteína é hipofucosilado ou não fucosilado e possui quantidades reduzidas de resíduo fucosil ou nenhum resíduo fucosil.

8. Anticorpo da reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que é produzido por expressão recombinante em uma linhagem celular de mamífero com expressão deficiente do gene FUT8 que codifica a fucosiltransferase, aumentando assim a atividade ADCC dos anticorpos produzidos no mesmo em comparação com uma linhagem celular que expressa o gene FUT8 do tipo selvagem.

9. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para uso como medicamento.

10. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de um distúrbio patológico que é mediado pelo receptor BAFF ou que pode ser tratado matando ou esgotando células B.

11. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de doenças autoimunes.

12. Anticorpo ou proteína funcional, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren, pênfigo vulgar ou esclerose múltipla.

13. Composição farmacêutica para o tratamento de artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren, esclerose múltipla, pênfigo vulgar, linfoma, leucemia ou mieloma, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo ou proteína funcional como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3.

FIG. 1

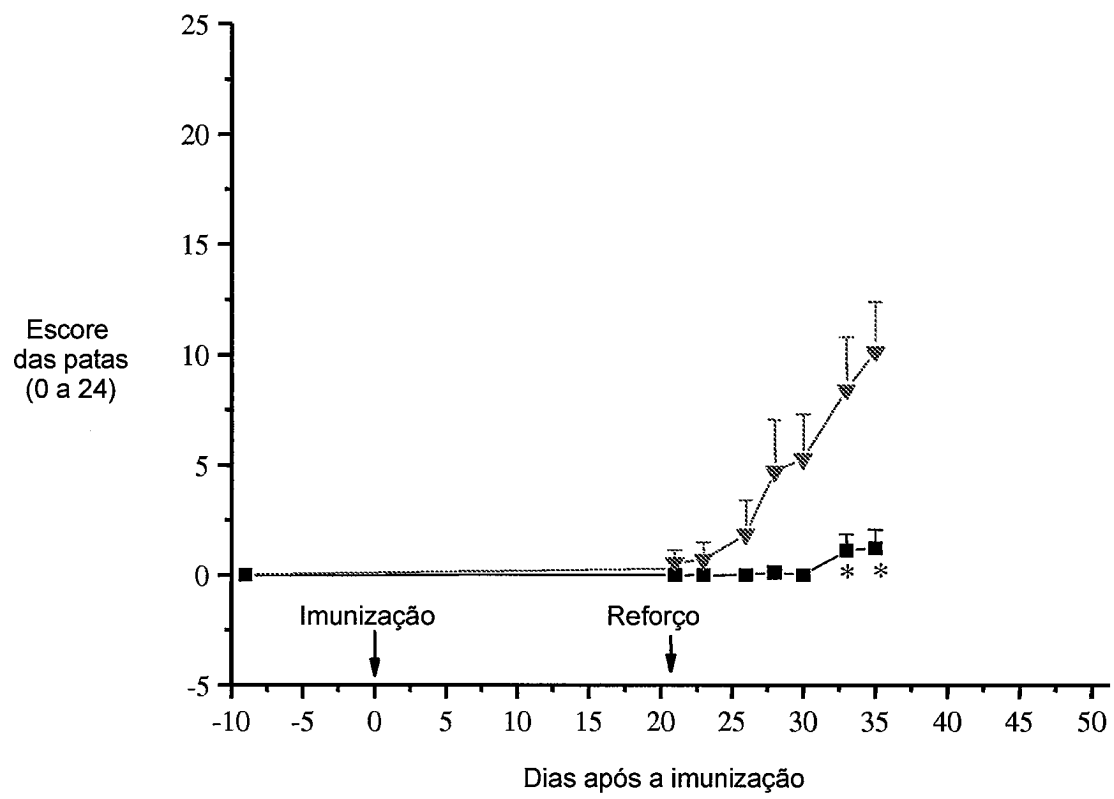


FIG. 2

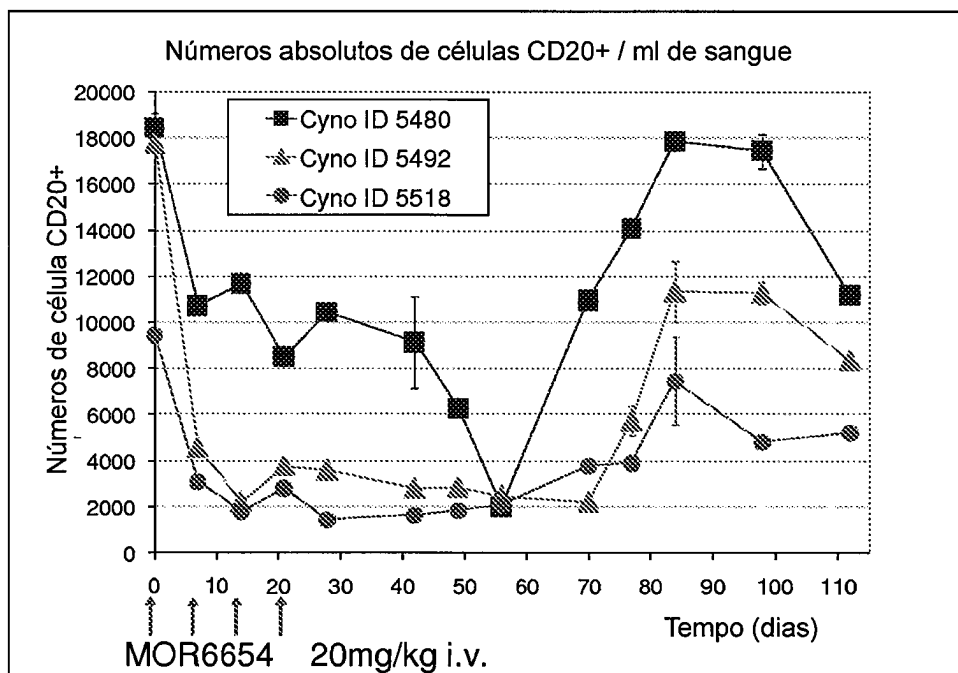
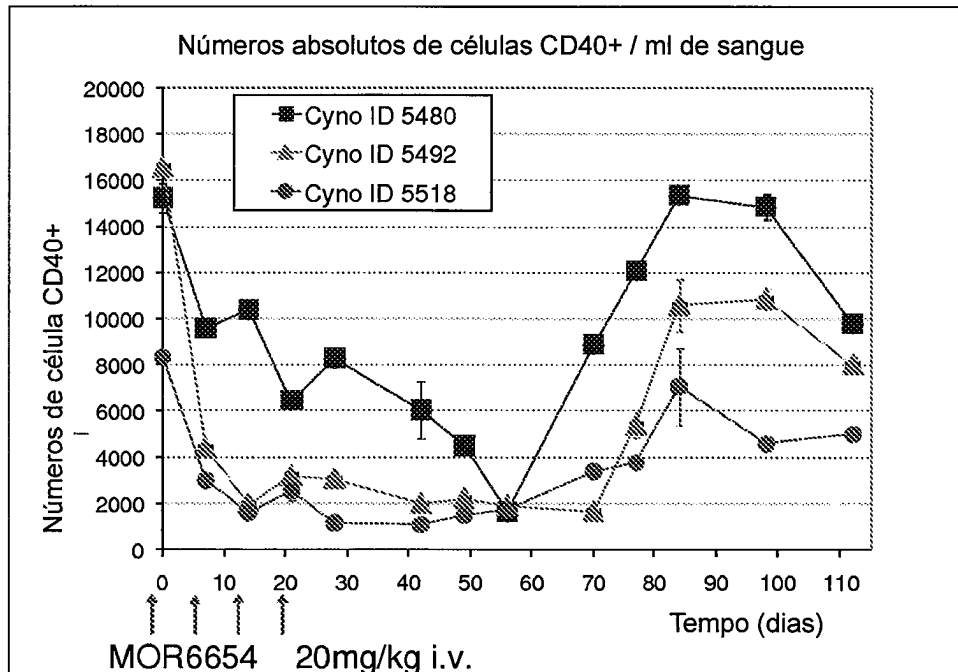


FIG. 3A

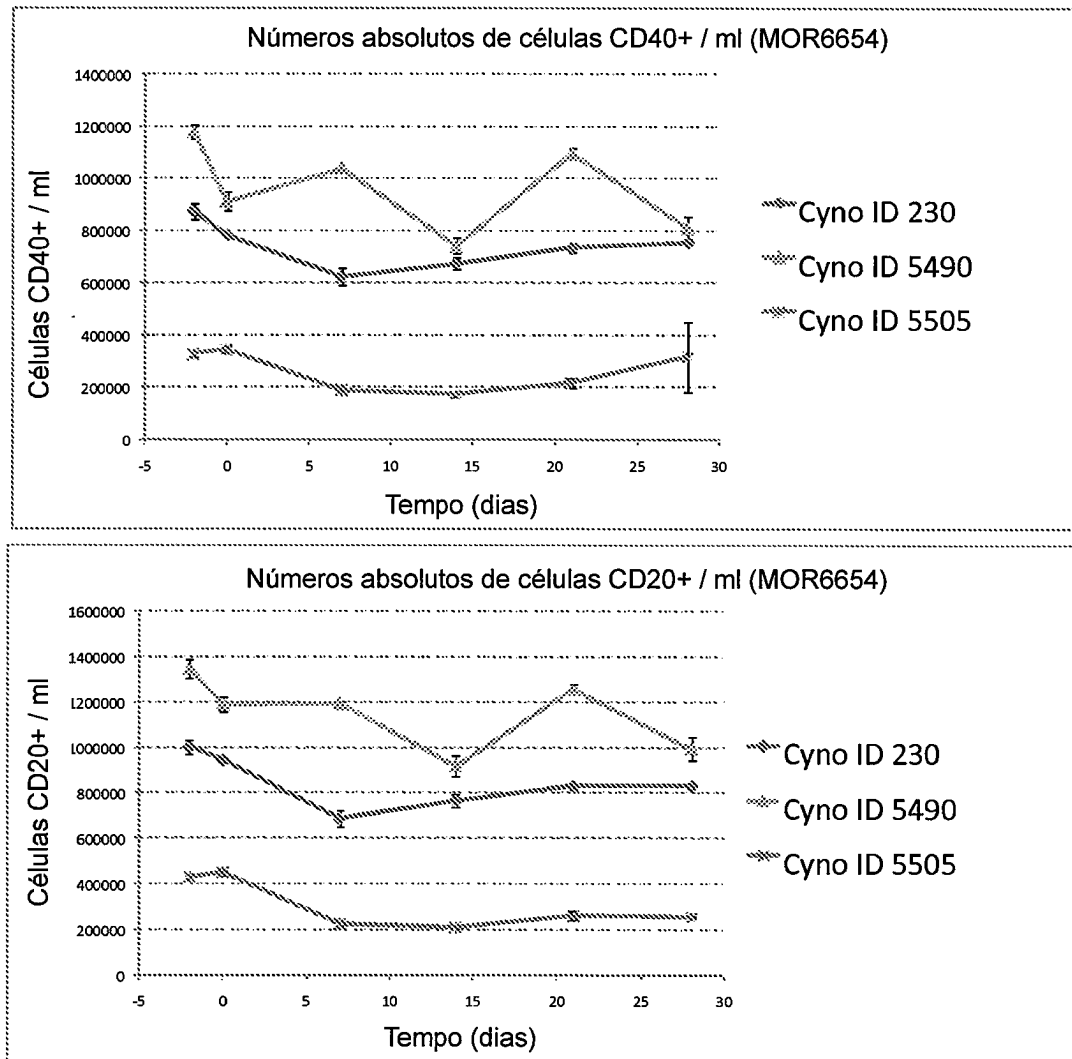


FIG. 3B

