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

(11) PI 0403964-5 B1

(22) Data do Depósito: 29/03/2004

(45) Data de Concessão: 06/10/2020

(54) Título: FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTÁVEIS, ARTIGO MANUFATURADO E USO DESSAS FORMULAÇÕES PARA O TRATAMENTO DE DISFUNÇÃO MEDIADA POR IGE

(51) Int.Cl.: A61K 39/395; A61K 47/18; A61K 47/06.

(30) Prioridade Unionista: 04/04/2003 US 60/460,659.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG; GENENTECH, INC..

(72) Inventor(es): JUN LIU; STEVEN SHIRE.

(86) Pedido PCT: PCT US2004009613 de 29/03/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/091658 de 28/10/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/11/2004

(57) Resumo: FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTÁVEIS, ARTIGO MANUFATURADO E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÃO MEDIADA POR IgE O presente pedido refere-se a formulações de proteína e anticorpo altamente concentradas com viscosidade reduzida que são estáveis, relativamente isotônicas e são de baixa turbidez. As formulações são particularmente apropriadas para administração subcutânea. O pedido descreve ainda artigos manufaturados que contêm essas formulações e método de sua utilização para o tratamento de disfunções que podem ser tratadas pelo anticorpo ou proteína formulada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTÁVEIS, ARTIGO MANUFATURADO E USO DESSAS FORMULAÇÕES PARA O TRATAMENTO DE DISFUNÇÃO MEDIADA POR IgE"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a formulações altamente concentradas de anticorpos, que são particularmente apropriadas para administração subcutânea. A presente invenção fornece ainda formulações líquidas estáveis e altamente concentradas (por exemplo, ≥ 100 mg/ml de proteína).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Existe demanda significativa para formulações de anticorpos líquidos em alta concentração. Entretanto, as formulações de proteínas altamente concentradas apresentam diversos problemas. Um problema é a instabilidade devido à formação de particulados. Com preparações liofilizadas reconstituídas para gerar formulações líquidas, este problema foi abordado através do uso de tensoativos (tais como polissorbato), mas tensoativos são inadequados para formulações líquidas, pois eles dificultam o processamento adicional. Além disso, os tensoativos também não reduzem a maior viscosidade causada como resultado de numerosas interações intermoleculares da natureza macromolecular de anticorpos.

Embora os tensoativos tenham exibido redução significativa do grau de formação particulada de proteínas, eles não abordam o problema da maior viscosidade que dificulta a manipulação e administração de formulações de anticorpos concentrados. Os anticorpos tendem a formar soluções viscosas sob alta concentração devido à sua natureza macromolecular e potencial para interações intermoleculares. Além disso, açúcares farmaceuticamente aceitáveis são freqüentemente utilizados em grandes quantidades como estabilizantes. Esses açúcares podem aumentar as interações moleculares, de forma a aumentar a viscosidade da formulação. Formulações altamente

PI0403964 10

viscosas são de difícil fabricação, deposição em seringa e injeção subcutânea. O uso da força na manipulação das formulações viscosas gera formação de espuma excessiva, que pode gerar desnaturação e desativação da biologia ativa. Falta solução satisfatória deste problema.

Embora o estado da técnica indique numerosos exemplos de excipientes que podem ser empregados adequadamente para criar formulações farmacêuticas, muito poucas proteínas foram formuladas com sucesso acima de 100 mg/ml ou possuem técnicas para tanto descritas.

Os depositantes descobriram que arginina, especificamente arginina-HCl, é particularmente apropriada para formulações de anticorpos ou proteínas líquidas em alta concentração.

Formulações de proteínas liofilizadas isotônicas estáveis encontram-se descritas no documento WO 97/04801, publicado em 13 de fevereiro de 1997, cujo relatório descritivo é expressamente incorporado ao presente como referência. As formulações liofilizadas descritas podem ser reconstituídas para gerar formulações líquidas com alta concentração de proteína sem perda aparente de estabilidade. Entretanto, as questões potenciais associadas à alta viscosidade das formulações reconstituídas não são abordadas. A agregação de proteínas foi reduzida anteriormente através da adição de açúcares, mas isso aumenta dramaticamente a viscosidade e a osmolaridade, de forma a tornar impraticáveis o processamento e o uso.

O documento WO 02/30463, publicado em 18 de abril de 2002, descreve formulações com alta concentração de proteínas, mas baixa viscosidade, atingidas: 1) através de baixo pH (cerca de 4,0 a 5,3); 2) alto pH (cerca de 6,5 a 12,0) ou 3) aumento da resistência iônica total da formulação através da adição de sais ou tampões. Entretanto, embora a maior resistência iônica realmente reduza a viscosidade da formulação (tal como com NaCl), ela também pode resultar em solução mais turva, o que é freqüentemente

PI0409644

associado à formação de partículas de proteínas (por exemplo, agregação). Desta forma, formulação ideal com alta concentração de proteínas deve superar os desafios de estabilidade, viscosidade, osmolaridade e turbidez.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção aborda formulações de anticorpos ou proteínas, com alta concentração, que são estáveis e com baixa viscosidade e turbidez.

Particularmente, a presente invenção refere-se a formulações de anticorpos com alta concentração e baixa turbidez que compreendem proteína ou anticorpo (100 a 260 mg/ml), histidina (10 a 100 mM), arginina-HCl (50 a 200 mM) e polissorbato (0,01% a 0,1%), que possuem pH de 5,5 a 7,0, viscosidade de 50 cs ou menos e osmolaridade de 200 mOsm/kg a 450 mOsm/kg. Alternativamente, a proteína ou anticorpo nas formulações pode variar de 120 a 260 mg/ml, alternativamente 150 a 260 mg/ml, alternativamente 180 a 260 mg/ml, alternativamente 200 a 260 mg/ml de proteína ou anticorpo. Alternativamente, a osmolaridade varia de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg. Alternativamente, a concentração de arginina-HCl varia de 100 a 200 mM, alternativamente de 150 a 200 mM, alternativamente de 180 a 200 mM.

Alternativamente, a presente invenção refere-se a formulações de anticorpos com alta concentração e baixa turbidez que compreendem anticorpo (40 a 150 mg/ml), histidina (10 a 100 mM), açúcar (tal como trehalose ou sacarose, 20 a 350 mM) e polissorbato (0,01% a 0,1%).

Em realização específica, a presente invenção fornece uma formulação que contém altas concentrações de proteínas com grande peso molecular, tais como anticorpos ou imunoglobulinas. Os anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos dirigidos contra um antígeno específico previamente determinado. Em aspecto específico, o antígeno é IgE (por exemplo, rhuMAbE-25 e rhuMAbE-26 descritos na Patente US 6.329.509 e no documento WO

PI0403964

99/01556). Alternativamente, o anticorpo anti-IgE pode ser CGP-5101 (Hu-901) descrito em Corne et al, *J. Clin. Invest.* 99 (5): 879-887 (1997), documento WO 92/17207 e Depósitos ATTC nº BRL-10706 e 11130, 11131, 11132 e 11133. Alternativamente, o antígeno pode incluir: as proteínas CD CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 e CD40; membros da família de receptores HER tais como receptor EGF, receptor HER2, HER3 ou HER4; 2C4, 4D5, PSCA, LDP-2, moléculas de adesão celular tais como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e αv/β3 integrina, que incluem as suas subunidades α e β (por exemplo, anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento tais como VEGF; antígenos de grupos sangüíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidade (OB); receptor *mpl*; CTLA-4 e proteína C.

As formulações de acordo com a presente invenção podem ser formulações farmacêuticas. Em aspecto específico, a formulação é fornecida por via subcutânea.

Em ainda outra realização, a presente invenção fornece um método de tratamento, profilático ou terapêutico, de disfunções que podem ser tratadas pela proteína ou anticorpo formulado, que compreende a administração das formulações descritas no presente que compreendem quantidade terapeuticamente eficaz da proteína ou anticorpo. Estas formulações são particularmente úteis para administração subcutânea. Em aspecto específico, a disfunção é disfunção mediada por IgE. Em ainda outro aspecto específico, a disfunção mediada por IgE é rinite alérgica, asma (tal como asma alérgica e asma não alérgica), dermatite atópica, gastroenteropatia alérgica, hipersensibilidade (tal como analfilaxia, urticária, alergias alimentares etc.), aspergilose broncopulmonar alérgica, doenças parasíticas, cistite intersticial, síndrome de hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma de IgE e reação de enxerto contra hospedeiro.

PI0403964

Em ainda outra realização, a presente invenção fornece um artigo manufaturado que compreende um recipiente que inclui uma formulação descrita no presente. Em um aspecto, o artigo manufaturado é uma seringa previamente cheia. Em ainda outro aspecto específico, a seringa previamente cheia contém adicionalmente um dispositivo de injeção. Em ainda outro aspecto específico, o dispositivo de injeção é um autoinjetor.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: cromatografia de interação hidrofóbica de um anticorpo monoclonal anti-IgE digerido por pepsina. As amostras foram formuladas em diferentes pH e tampões: (•) 20 mM de acetato, (Δ) 20 mM de succinato, (▲) 20 mM de Na_2HPO_4, (Λ) 20 mM de K_2PO_4 e (*) 20 mM de tampão Tris. As amostras foram armazenadas a 30 °C por seis meses.

Figura 2: cromatografia de exclusão de tamanhos de anticorpo monoclonal anti-IgE armazenado a 40 °C por seis meses. As amostras foram formuladas em diferentes pH e tampões: (■) 20 mM de glutamato, (•) 20 mM de acetato, (Δ) 20 mM de succinato, (□) 20 mM de histidina, (▲) 20 mM de Na_2HPO_4, (▼) 20 mM de K_2PO_4 e (*) 20 mM de tampão Tris.

Figura 3: atividade de anticorpo monclonal anti-IgE armazenado a 30 °C por seis meses. Amostras foram formuladas em diferentes pH e tampões: (•) 20 mM de acetato, (Δ) 20 mM de succinato, (□) 20 mM de histidina, (▲) 20 mM de Na_2HPO_4, (▼) 20 mM de K_2PO_4 e (*) 20 mM de tampão Tris.

Figura 4: efeitos de polissorbato 20 sobre a turbidez do anticorpo monoclonal anti-IgE tensionado. Amostras contêm 100 mg/ml de anticorpo, 20 mM de succinato, 192 mM de trehalose e várias quantidades de polissorbato 20 sob pH 6,0. As concentrações de polissorbato são (■) 0, (▲) 0,01%, (•) 0,02% e (Δ) 0,05%.

Figura 5: turbidez de anticorpo monoclonal anti-IgE a cerca de 150 mg/ml com diferentes excipientes (▲) $CaCl_2$, (▽) $MgCl_2$ e (Δ) arginina-HCl.

PI0403964

Figura 6: turbidez de anticorpo monoclonal anti-IgE a cerca de 150 mg/ml com vários excipientes. As amostras foram armazenadas a (▲) -70 °C, (■) 2 a 8 °C, (Δ) 15 °C, (□) 30 °C e (∇) 40 °C.

Figura 7: análises por cromatografia de interação hidrofóbica de anticorpo monoclonal anti-IgE digerido por papaína. Amostras foram formuladas a cerca de 150 mg/ml com vários excipientes e armazenadas a (▼) -70 °C, (■) 2 a 8 °C, (▲) 15 °C, (Δ) 30 °C e (□) 40 °C.

Figura 8: cromatografia de exclusão de tamanho de anticorpo monoclonal anti-IgE a cerca de 150 mg/ml em (■) 200 mM de arginina-HCl, 23 mM de histidina, pH 6,0; (▲) 182 mM de arginina-HCl, 20 mM de histidina, pH 6,0; (●) 182 mM de arginina-HCl, 20 mM de histidina, 91 mM de sacarose, pH 6,0; (□) 50 mM de $MgCl_2$, 27 mg/ml de trehalose, 0,01% de acetato; (Δ) 50 mM de $MgCl_2$, 30 mM de $MgAc_2$, 0,01% de acetato e (○) 50 mM de $MgCl_2$, 45 mM de $MgAc_2$, 0,01% de acetato. As amostras foram armazenadas a 30 °C por seis meses.

Figura 9: análises de cromatografia de interação hidrofóbica de anticorpo monoclonal anti-IgE digerido por papaína. As amostras exibidas foram formuladas em (■) 200 mM de arginina-HCl, 23 mM de histidina, (▲) 182 mM de arginina-HCl, 20 mM de histidina, (●) 182 mM de arginina-HCl, 20 mM de histidina, 91 mM de sacarose, (□) 50 mM de $MgCl_2$, 27 mg/ml de trehalose, 0,01% de acetato, (Δ) 50 mM de $MgCl_2$, 30 mM de $MgAc_2$, 0,01% de acetato e (○) 50 mM de $MgCl_2$, 45 mM de $MgAc_2$, 0,01% de acetato. As amostras foram armazenadas a 30 °C por seis meses.

Figura 10: exibe comparação das seqüências de comprimento total (tanto cadeias variáveis como constantes) dos anticorpos anti-IgE E25, E26 e Hu-901. As regiões de CDR de Hu-901 são exibidas sublinhadas. Para E25 e E26, as regiões de CDR, conforme definido por Chothia, são exibidas em negrito, enquanto a região de CDR, conforme definido por Kabat, é delineada

com parênteses. A Figura 10A exibe as seqüências de cadeia leve de E25, E26 e Hu-901 (SEQ ID Nº 1 a 3), enquanto a Figura 10B exibe as seqüências de cadeia pesada de E25, E26 e Hu-901 (SEQ ID Nº 4 a 6).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES:

Por "proteína", indica-se uma seqüência de aminoácidos para os quais o comprimento de cadeia é suficiente para produzir os níveis mais altos de estrutura terciária e/ou quaternária. Desta forma, as proteínas são diferenciadas dos "peptídeos" que também são moléculas com base em aminoácidos que não contêm essa estrutura. Tipicamente, uma proteína para uso no presente possuirá peso molecular de pelo menos cerca de 15 a 20 kD, preferencialmente pelo menos cerca de 20 kD.

Exemplos de proteínas englobadas na definição do presente incluem proteínas de mamíferos, tais como hormônio do crescimento, incluindo hormônio do crescimento humano e hormônio do crescimento bovino; fator de liberação de hormônio do crescimento; hormônio da paratireóide; hormônio estimulante da tireóide; lipoproteínas; α-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; proinsulina; hormônio estimulante dos folículos; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores coagulantes, tais como fator VIIIC, fator IX, fator de tecido e fator von Willebrands; fatores anticoagulantes tais como Proteína C; fator natriurético atrial; tensoativo dos pulmões; ativador plasminogênio, tal como uroquinase ou ativador plasminogênio do tipo de tecido (t-PA, tal como Activase®, TNKase®, Retevase®); bombazina; trombina; fator de necrose tumorosa α e β; encefalinase; RANTES (célula T normalmente regulada na ativação expressa e segregada); proteína inflamatória de macrófagos humanos (MIP-1-α); albumina do soro, tal como albumina do soro humano; substância inibidora mulleriana; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; pró-relaxina; peptídeo associado a

PI0409864

gonadotropina de camundongos; DNAse; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores do crescimento; integrina; proteína A ou D; fatores reumatóides; fator neurotrófico, tal como fator neurotrófico derivado de ossos (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5 ou 6 (NT-3, NT-4, NT-5 ou NT-6) ou fator de crescimento dos nervos, tal como NGF-β; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastas, tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento de transformação (TGF), tal como TGF-α e TGF-β, incluindo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 ou TGF-β5; fator I e II de crescimento similar a insulina (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I do cérebro); proteínas de ligação de fator de crescimento similar a insulina; proteínas CD, tais como CD3, CD4, CD8, CD19 e CD20; eritropoietina (EPO); trombopoietina (TPO); fatores osteoindutivos; imunotoxinas; proteína morfogenética dos ossos (BMP); interferona, tal como interferona-α, β e γ; fatores estimulantes de colônias (CSFs), tais como M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), tais como IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; receptores de células T; proteínas de membrana de superfície; fator de aceleração da deterioração (DAF); antígeno viral, tal como uma parte do envelope contra a AIDS; proteínas de transporte; receptores domésticos; adressinas; proteínas reguladoras; imunoadesinas; anticorpos; e fragmentos ou variantes biologicamente ativas de quaisquer dos polipeptídeos relacionados acima.

A proteína que é formulada é preferencialmente essencialmente pura e desejavelmente essencialmente homogênea (ou seja, livre de proteínas contaminantes). Proteína "essencialmente pura" indica uma composição que compreende pelo menos cerca de 90% em peso da proteína, com base no peso total da composição, preferencialmente pelo menos cerca de 95% em peso. Proteína "essencialmente homogênea" indica uma composição que compreende pelo menos cerca de 99% em peso de proteína, com base no

PI0403964

peso total da composição.

Em certas realizações, a proteína é um anticorpo. O anticorpo pode ligar-se, por exemplo, a qualquer das moléculas mencionadas acima. Exemplos de alvos moleculares para anticorpos englobados pela presente invenção incluem IgE, as proteínas CD CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 e CD40; membros da família de receptores HER, tais como receptor EGF, receptor HER2, HER3 ou HER4; 2c4, 4D5, PSCA, LDP-2, moléculas de adesão celular tais como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e αv/β3 integrina, incluindo as suas subunidades α e β (tais como anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento tais como VEGF; antígenos de grupos sangüíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidade; receptor *mpl*, CTLA-4 e proteína C.

O termo "anticorpo", da forma utilizada no presente, inclui anticorpos monoclonais (que incluem anticorpos de comprimento total que contêm região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpos com especificidade poliepitópica, anticorpos multiespecíficos (tais como anticorpos biespecíficos, diacorpos e moléculas de cadeia simples, bem como fragmentos de anticorpos (tais como Fab, $F(ab')_2$ e Fv)). O termo "imunoglobulina" (Ig) é utilizado de forma intercambiável com "anticorpo" no presente.

A unidade de anticorpo de quatro cadeias básica é uma glicoproteína heterotetramérica composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Um anticorpo IgM consiste de cinco das unidades heterotetraméricas básicas com um polipeptídeo adicional denominado cadeia J e contém dez locais de ligação de antígenos, enquanto os anticorpos IgA compreendem de duas a cinco das unidades de quatro cadeias básicas que podem polimerizar-se para formar conjuntos polivalentes em combinação com a cadeia J. No caso de IgGs, a unidade de quatro cadeias é geralmente de cerca de 150.000 daltons. Cada cadeia L é ligada a uma

cadeia H por uma ligação de dissulfeto covalente, enquanto as duas cadeias H são ligadas entre si por uma ou mais ligações de dissulfeto, dependendo do isotipo de cadeia H. Cada cadeia H e L também contém as pontes de dissulfeto intracadeias em espaços regulares. Cada cadeia H contém, no terminal N, um domínio variável (V_H) seguido por três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias α e γ e quatro domínios C_H para os isotipos μ e ε. Cada cadeia L contém, no terminal N, um domínio variável (V_L) seguido por domínio constante na sua outra extremidade. O V_L é alinhado com o V_H e o C_L é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada (C_H1). Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada. O emparelhamento de V_H e V_L entre si forma um local de ligação de antígenos isolado. Para estrutura e propriedades das diferentes classes de anticorpos, vide, por exemplo, *Basic and Clinical Immunology*, oitava edição, Daniel P. Sties, Abba I. Terr e Tristram G. Parsolw (eds.), Appleton & Lange, Norwalk CT, Estados Unidos, 1994, pág. 71 e capítulo 6.

A cadeia L de qualquer espécie de vertebrados pode ser atribuída a um dentre dois tipos claramente distintos, denominados capa e lambda, com base nas seqüências de aminoácidos dos seus domínios constantes. Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas (CH), imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes ou isotipos. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que contêm cadeias pesadas denominadas α, δ, ε, γ e μ, respectivamente. As classes γ e μ são adicionalmente divididas em subclasses com base nas diferenças relativamente pequenas na seqüência e função de CH; seres humanos, por exemplo, expressam as subclasses a seguir: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

O termo "variável" refere-se ao fato de que certos segmentos dos

domínios variáveis diferem extensamente de seqüência entre os anticorpos. O domínio V media a ligação de antígenos e define a especificidade de um anticorpo específico para o seu antígeno específico. Entretanto, a variabilidade não é distribuída regularmente ao longo de todo o conjunto dos domínios variáveis. Ao contrário, as regiões V consistem de estiramentos relativamente invariáveis denominados regiões de estrutura (FRs) com cerca de quinze a trinta resíduos de aminoácidos separados por regiões mais curtas de extrema variabilidade denominadas "regiões hipervariáveis" ou, às vezes, "regiões de determinação de complementaridade" (CDRs) que contêm cerca de nove a doze resíduos de aminoácidos de comprimento cada uma. Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada uma, adotando em grande parte configuração de folha β, conectadas por três regiões hipervariáveis, que formam circuitos que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha β. As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em boa proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação de antígenos de anticorpos (vide Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD, Estados Unidos (1991)). Os domínios constantes não são envolvidos diretamente na ligação de anticorpo a antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como a participação da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

A expressão "região hipervariável" (também conhecida como "regiões de determinação de complementaridade" ou CDRs), quando utilizada no presente, designa os resíduos de aminoácidos de um anticorpo que estão (normalmente três ou quatro regiões curtas de extrema variabilidade de seqüências) dentro do domínio de região V de uma imunoglobulina que formam o local de ligação de antígenos e são os principais determinantes da

PI0403964

especificidade de antígenos. Existem pelo menos dois métodos de identificação dos resíduos de CDR: (1) uma abordagem baseada na variabilidade de seqüências em espécies cruzadas (ou seja, Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda MS, Estados Unidos, 1991)); e (2) abordagem baseada em estudos cristalográficos de complexos de antígeno e anticorpo (Chothia, C. et al, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Entretanto, até o ponto em que duas técnicas de identificação de resíduos definem regiões de sobreposição, mas não regiões idênticas, elas podem ser combinadas para definir CDR híbrida.

A expressão "anticorpo monoclonal", da forma utilizada no presente, designa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural e/ou modificações pós-tradução (tais como isomerizações e amidações) que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um local antigênico isolado. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante sobre o antígeno. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos porque são sintetizados pelo cultivo de hibridomas, não contaminados por outras imunoglobulinas. O adjetivo "monoclonal" indica a característica do anticorpo como sendo obtido a partir de população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser considerado exigindo a produção do anticorpo através de qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados, por exemplo, através do método de hibridoma descrito em primeiro lugar por Kohler

PI0403964

et al, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser fabricados através de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Os anticorpos monoclonais do presente incluem especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas), em que uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a seqüências correspondentes de anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada; Patente US 4.816.567; e Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 6851-6855 (1984). Os anticorpos quiméricos de interesse no presente incluem anticorpos "primitizados" que compreendem seqüências de ligação de antígenos de domínio variável derivadas de primatas não humanos (tais como Macaco do Velho Mundo, chimpanzé etc.) e seqüências de região de contato humanas.

Um anticorpo "intacto" é aquele que compreende um local de ligação de antígenos, bem como CL e pelo menos os domínios de cadeia pesada, C_H1, C_H2 e C_H3. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de seqüência nativa (tais como domínios constantes de seqüência nativa humana) ou suas variantes de seqüências de aminoácidos. Preferencialmente, o anticorpo intacto possui uma ou mais funções efetoras.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma parte de anticorpo intacto, preferencialmente a região variável e/ou de ligação de antígenos do

PI0403964

anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', $F(ab')_2$ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (vide a Patente Norte-Americana n° 5.641.870, Exemplo 2; Zapata et al, *Protein Eng.*, 8 (10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

A digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos idênticos de ligação de antígenos, denominados fragmentos "Fab", e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade de cristalização rápida. O fragmento Fab consiste de uma cadeia L inteira juntamente com o domínio de região variável da cadeia H (V_H) e o primeiro domínio constante de uma cadeia epsada (C_H1). Cada fragmento Fab é monovalente com relação à ligação de antígenos, ou seja, contém um local de ligação de antígenos isolado. O tratamento com pepsina gera um único fragmento $F(ab')_2$ grande corresponde, de forma geral, a dois fragmentos de Fab ligados por dissulfeto que possuem atividade de ligação de antígenos diferente e ainda é capaz de reticular antígeno. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab porque contêm alguns resíduos adicionais no terminal carbóxi do domínio C_H1, que incluem uma ou mais cisteínas da região de articulação de anticorpos. Fab'-SH é a denominação do presente para Fab' na qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contêm um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos Fab' que contêm cisteínas de articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

O fragmento Fc compreende as porções carbóxi-terminais das duas cadeias H mantidas juntas por dissulfetos. As funções efetoras de anticorpos são determinadas por seqüências na região Fc, que também é reconhecida por receptores Fc (FcR) encontrados em certos tipos de células.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de

PI0403964

reconhecimento e ligação de antígenos completo. Este fragmento consiste de um dímero de um domínio de região variável de cadeia leve e outro de cadeia pesada em associação firme e não covalente. A partir da dobra desses dois domínios, emanam seis circuitos hipervariáveis (três circuitos cada da cadeia H e L) que contribuem com os resíduos de aminoácidos para ligação de antígenos e conferem especificidade de ligação de antígenos para o anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou metade de um Fv que compreende apenas três CDRs específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em afinidade menor que todo o local de união.

"Fv de cadeia isolada", também abreviado "sFv" ou "scFv", são fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios de anticorpos V_H e V_L conectados a uma única cadeia de polipeptídeo. Preferencialmente, o polipeptídeo sFv compreende adicionalmente um ligante de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite que o sFv forme a estrutura desejada para a ligação de antígenos. Para análise de sFv, vide Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg e Moore, eds. (Springer-Verlag, Nova Iorque, Estados Unidos, 1994), págs. 269-315.

O termo "diacorpos" designa fragmentos de anticorpos pequenos preparados através d construção de fragmentos de sFv (vide parágrafo anterior) com ligantes curtos (cerca de cinco a dez resíduos) entre os domínios V_H e V_L, de tal forma que seja atingido o emparelhamento intercadeias mas não intracadeias dos domínios V, de forma a resultar em fragmento bivalente, ou seja, fragmento que contém dois locais de ligação de antígenos. Diacorpos biespecíficos são heterodímeros de dois fragmentos de sFv "cruzados", nos quais os domínios V_H e V_L dos dois anicorpos estão presentes em cadeias de polipeptídeos diferentes. Os diacorpos são descritos em maiores detalhes, por exemplo, na Patente EP 404.097; documento WO 93/11161; e Hollinger et al,

PI0403964

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 6444-6448 (1993).

Um anticorpo que "se liga especificamente a" ou "é específico para" um polipeptídeo específico ou um epítopo sobre um polipeptídeo específico é aquele que se liga àquele polipeptídeo específico ou epítopo sobre polipeptídeo específico, sem ligar-se substancialmente a nenhum outro polipeptídeo ou epítopo de polipeptídeo.

A expressão "fase sólida" indica uma matriz não aquosa à qual pode aderir-se o anticorpo de acordo com a presente invenção. Exemplos de fases sólidas englobadas no presente incluem as formadas parcial ou completamente de vidro (por exemplo, vidro de poros controlados), polissacarídeos (por exemplo, agarose), poliacrilamidas, poliestireno, álcool polivinílico e silicones. Em certas realizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender a cavidade de uma placa de ensaio; em outros, é uma coluna de purificação (por exemplo, coluna de cromatografia de afinidade). Esta expressão também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como as descritas na Patente US 4.275.149.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ ou outras subseqüências de anticorpos que ligam antígenos) principalmente de seqüências humanas, que contêm seqüência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Em sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), em que resíduos de uma região hipervariável (também CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato ou coelho que apresenta a capacidade, afinidade e especificidade desejada. Em alguns casos, os resíduos de região estrutural (FR) Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além

PI0403964

disso, "anticorpos humanizados", da forma utilizada no presente, podem também compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor, nem no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais e otimizar o desempenho do anticorpo. Idealmente, o anticorpo humanizado também compreenderá pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana. Para maiores detalhes, vide Jones et al, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

"Anticorpo dependente de espécie", tal como anticorpo anti-IgE humano de mamíferos, é um anticorpo que possui afinidade de ligação mais forte para um antígeno de primeira espécie de mamífero que para um homólogo daquele antígeno de uma segunda espécie de mamífero. Normalmente, o anticorpo dependente de espécie "liga-se especificamente" a um antígeno humano (ou seja, possui valor de afinidade de ligação (Kd) de não mais de cerca de 1×10^{-7} M, alternativamente não mais de cerca de 1×10^{-8} M, alternativamente não mais de cerca de 1×10^{-9} M), mas possui afinidade de ligação para um homólogo do antígeno de uma segunda espécie de mamífero não humana que é pelo menos cerca de cinqüenta vezes, pelo menos cerca de quinhentas vezes ou pelo menos cerca de mil vezes mais alerta que a sua afinidade de ligação para o antígeno não humano. O anticorpo dependente de espécie pode ser de qualquer dos vários tipos de anticorpos definidos acima, mas é preferencialmente um anticorpo humano ou humanizado.

As "funções efetoras" de anticorpos designam as atividades biológicas atribuíveis à região Fc (região Fc de seqüência nativa ou região Fc com variação de seqüência de aminoácidos) de um anticorpo e variam de acordo com o isotipo do anticorpo. Exemplos das funções efetoras de anticorpos incluem: citotoxicidade dependente de complemento e ligação de

PI0403964

C1q; ligação de receptor de Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulagem para baixo de receptores de superfície celular (por exemplo, receptores de células B); e ativação de células B.

"Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos" ou "ADCC" designa uma forma de citotoxicidade, em que Ig segregado e ligado a receptores de Fc (FcRs) presentes sobre certas células citotóxicas (por exemplo, Células Matadoras Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) permitem que essas células efetoras citotóxicas liguem-se especificamente a uma célula alvo que apresente antígenos e subseqüentemente matem a célula alvo com citotoxinas. Os anticorpos "armam" as células citotóxicas e são necessários para matar a célula alvo através deste mecanismo. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam unicamente FcγRIII, enquanto os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de Fc sobre células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 da página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para determinar a atividade de ADCC de uma molécula de interesse, pode-se realizar teste de ADCC *in vitro*, tal como descrito na Patente US 5.500.362 ou US 5.821.337. Células efetoras úteis para esses testes incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC) e células Matadoras Naturais (NK). Alternativa ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal tal como o descrito em Clynes et al, *PNAS (U. S. A.)* 95: 652-656 (1998).

"Receptor de Fc" ou "FcR" descreve um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de seqüência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que liga um anticorpo de IgG (receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses

PI0403964

receptores. Os receptores de FcγRII incluem FcγRIIA ("receptor de ativação") e FcγRIIB ("receptor de inibição"), que possuem seqüências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplásmicos. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM) no seu domínio citoplásmico. O receptor de inibição FcγRIIB contém um motivo de inibição com base em tirosina imunorreceptora (ITIM) no seu domínio citoplásmico (vide Daëron, M., *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcRs são analisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" no presente. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto (Guyer et al, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim et al, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e desempenham funções efetoras. Preferencialmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC), células matadoras naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMCs e células MNK sendo preferidas. As células efetoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa, tal como sangue.

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" designa a lise de uma célula alvo na presença de complemento. A ativação do processo clássico de complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a anticorpos (da subclasse apropriada) que são ligados ao seu antígeno cognato. Para determinar a ativação do complemento, pode ser realizado um ensaio de CDC, conforme descrito, por exemplo, em

PI0403964

Gazzano-Santoro et al, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

"Isolado", quando utilizado para descrever os vários polipeptídeos e anticorpos descritos no presente, indica um polipeptídeo ou anticorpo que tenha sido identificado, separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente de produção. Preferencialmente, o polipeptídeo isolado é livre de associação com todos os demais componentes do seu ambiente de produção. Os componentes contaminantes do seu ambiente de produção, tais como os resultantes de células transfectadas recombinantes, são materiais que tipicamente interfeririam nos usos em diagnóstico ou terapêuticos para o polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em realizações preferidas, o polipeptídeo será purificado (1) até grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de seqüência de aminoácidos interna ou N-terminal através do uso de um seqüenciador de xícaras de agitação ou (2) até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferencialmente, manchas de prata. Normalmente, entretanto, um anticorpo ou polipeptídeo isolado será preparado através de pelo menos uma etapa de purificação.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" que codifica os polipeptídeos e anticorpos do presente é uma molécula de ácido nucleico isolada que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual é normalmente associada no ambiente no qual foi produzida. Preferencialmente, o ácido nucleico isolado é livre de associação com todos os componentes associados ao ambiente de produção. As moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam os polipeptídeos e anticorpos do presente encontram-se em forma diferente da forma ou ambiente no qual são encontradas na natureza. As moléculas de ácido nucleico isoladas são diferenciadas, portanto, do ácido nucleico que codifica os polipeptídeos e

P10403964

anticorpos do presente que existem naturalmente nas células.

A expressão "seqüências de controle" designa seqüências de DNA necessárias para a expressão de seqüência de codificação ligada operativamente em organismo hospedeiro específico. As seqüências de controle que são apropriadas para procariotes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma seqüência de operadores, e um local de ligação de ribossomos. As células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de adenilação e amplificadores.

Ácido nucleico é "ligado operativamente" quando é colocado em relação funcional com outra seqüência de ácido nucleico. DNA para uma seqüência prévia ou líder de secreção, por exemplo, é ligado operativamente a DNA para um polipeptídeo caso seja expresso na forma de proteína prévia que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou amplificador é ligado operativamente a uma seqüência de codificação caso afete a transcrição da seqüência; ou um local de ligação de ribossomo é ligado operativamente a uma seqüência de codificação caso seja posicionado de forma a possibilitar a tradução. Geralmente, "ligado operativamente" indica que as seqüências de DNA sendo ligadas são contíguas e, no caso de líder de secreção, contíguas e em fase de leitura. Os amplificadores, entretanto, não necessitam ser contíguos. A ligação é obtida através de ligação em locais de restrição convenientes. Caso estes locais não existam, os adaptadores de oligonucleotídeos sintéticos ou ligantes são utilizados de acordo com a prática convencional.

A expressão "marcado por epítopo", quando utilizada no presente, designa um polipeptídeo quimérico que compreende um polipeptídeo ou anticorpo descrito no presente como fundido a um "polipeptídeo de marca". O polipeptídeo de marca contém resíduos suficientes para fornecer um epítopo contra o qual pode ser fabricado um anticorpo, mas é suficientemente curto

PI0403964

para não interferir com a atividade do polipeptídeo ao qual é fundido. O polipeptídeo de marca também é, de preferência, razoavelmente exclusivo, de forma que o anticorpo não apresenta reação cruzada substancial com outros epítopos. Os polipeptídeos de marca apropriados contêm geralmente pelo menos seis resíduos de aminoácidos e normalmente cerca de 8 a 50 resíduos de aminoácidos (preferencialmente, cerca de dez a vinte resíduos de aminoácidos).

Da forma utilizada no presente, o termo "imunoadesina" designa moléculas similares a anticorpos que combinam a especificidade de ligação de proteína heteróloga ("adesina") com as funções efetoras de domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem fusão de seqüência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada que é diferente do local de ligação e reconhecimento de antígenos de um anticorpo (ou seja, é "heterólogo") e uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina. A parte de adesina de uma molécula de imunoadesina é tipicamente uma seqüência de aminoácidos contígua que compreende pelo menos o local de ligação de um receptor ou ligante. A seqüência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida a partir de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM. As fusões de Ig incluem preferencialmente a substituição de um domínio de um polipeptídeo ou anticorpo descrito no presente no lugar de pelo menos uma região variável em uma molécula Ig. Em realização particularmente preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões de articulação, CH2 e CH3 ou as regiões de articulação, CH1, CH2 e CH3 de uma molécula IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina, vide também a Patente US 5.428.130, emitida em 27 de junho de 1995.

Formulação "estável" é aquela em que a proteína retém

PI0403964

essencialmente a sua estabilidade físico-química e integridade durante a armazenagem. Várias técnicas analíticas de medição da estabilidade de proteínas são disponíveis na técnica e analisadas em *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Nova Iorque, Estados Unidos, Pubs. (1991) e Jones, A., *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). A estabilidade pode ser medida sob temperatura selecionada por período de tempo selecionado. Para seleção rápida, a formulação pode ser mantida a 40 °C por duas semanas a um mês, quando é medida a estabilidade ao longo do tempo. Quando a formulação necessitar ser armazenada a 2 até 8 °C, geralmente a formulação deverá ser estável a 30 °C ou 40 °C por pelo menos um mês e/ou estável a 2 até 8 °C por pelo menos dois anos. Quando a formulação necessitar ser armazenada a 30 °C, geralmente a formulação deverá ser estável por pelo menos dois anos a 30 °C e/ou estável a 40 °C por pelo menos seis meses. A extensão da agregação durante a armazenagem pode ser utilizada, por exemplo, como indicador da estabilidade da proteína. Desta forma, formulação "estável" pode ser aquela em que menos de cerca de 10% e, preferencialmente, menos de cerca de 5% da proteína estão presentes na forma de agregado na formulação. Em outras realizações, pode ser determinado qualquer aumento da formação de agregados durante a armazenagem da formulação.

Formulação "reconstituída" é aquela que foi preparada através da dissolução de proteína liofilizada ou formulação de anticorpo em diluente tal que a proteína através dela. A formulação reconstituída é apropriada para administração (tal como administração parenteral) a um paciente a ser tratado com a proteína de interesse e, em certas realizações da presente invenção, pode ser aquela que seja apropriada para administração subcutânea.

Formulação "isotônica" é aquela que possui essencialmente a mesma pressão osmótica do sangue humano. As formulações isotônicas

PI0403964

geralmente possuirão pressão osmótica de cerca de 250 a 350 mOsm. O termo "hipotônico" descreve uma formulação com pressão osmótica abaixo do sangue humano. Conseqüentemente, o termo "hipertônico" é utilizado para descrever uma formulação com pressão osmótica acima do sangue humano. A isotonicidade pode ser medida utilizando, por exemplo, osmômetro do tipo congelamento de gelo ou pressão de vapor. As formulações de acordo com apresente invenção são hipertônicas como resultado da adição de sal e/ou tampão.

Formulação "reconstituída" é aquela que foi preparada através da dissolução de formulação de proteína liofilizada em diluente tal que a proteína seja dispersa na formulação reconstituída. A formulação reconstituída é apropriada para administração (tal como administração parenteral) a um paciente a ser tratado com a proteína de interesse e, em certas realizações da presente invenção, pode ser aquela que seja apropriada para administração subcutânea.

"Ácido farmaceuticamente aceitável" inclui ácidos orgânicos e inorgânicos que são não tóxicos à concentração e na forma em que são formulados. Os ácidos inorgânicos apropriados incluem, por exemplo, clorídrico, perclórico, bromídrico, iodídrico, nítrico, sulfúrico, sulfônico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbônico etc. Os ácidos orgânicos apropriados incluem alquila, aromáticos, cíclicos, cicloalifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, saturados, insaturados, mono, di e tricarboxílicos de cadeia linear e ramificada, que incluem, por exemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, *t*-butil acético, antranílico, propanóico, 2-hidroxipropanóico, 2-oxopropanóico, propanodióico, ciclopentanopropiônico, ciclopentanopropiônico, 3-fenilpropiônico, butanóico, butanodióico, benzóico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzóico, 2-acetóxi-benzóico, ascórbico, cinâmico, lauril sulfúrico, esteárico, mucônico, mandélico, succínico, embônico, fumárico,

PI0403964

málico, maleico, hidroximaleico, malônico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicônico, glucônico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmóico, palmeico, tiociânico, metanossulfônico, etanossulfônico, 1,2-etanodissulfônico, 2-hidroxietanossulfônico, benzenossulfônico, 4-clorobenzenossulfônico, naftaleno-2-sulfônico, *p*-toluenossulfônico, canforsulfônico, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptônico, 4,4'-metilenobis-3-(hidróxi-2-eno-1-carboxílico) e hidroxinaftóico.

"Bases farmaceuticamente aceitáveis" incluem bases orgânicas e inorgânicas que são não tóxicas na concentração e na forma em que são formuladas. As bases apropriadas incluem, por exemplo, as formadas a partir de metais formadores de bases inorgânicas, tais como lítio, sódio, potássio, magnésio, cálcio, amônio, ferro, zinco, cobre, manganês, alumínio, N-metilglucamina, morfolina, piperidina e bases não tóxicas orgânicas, que incluem amina primária, secundária e terciária, aminas substituídas, aminas cíclicas e resinas de troca de íons básicos (tais como $N(R')_4^+$ (em que R' é independentemente H ou C_{1-4} alquila, tal como amônio, Tris)), tais como resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, poliamina e similares. As bases não tóxicas orgânicas particularmente preferidas são isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina e cafeína.

Ácidos e bases farmaceuticamente aceitáveis adicionais que podem ser utilizados com a presente invenção incluem aqueles que são derivados dos aminoácidos, tais como histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e asparagina.

Sais e tampões "farmaceuticamente aceitáveis" incluem os

PI0403964

derivados de sais de adição de ácidos e bases dos ácidos e bases indicados acima. Tampões e/ou sais específicos incluem histidina, succinato e acetato.

"Lioprotetor" é uma molécula que, quando combinada com uma proteína de interesse, evita ou reduz significativamente a instabilidade física e/ou química da proteína durante a liofilização e subseqüente armazenagem. Exemplos de lioprotetores incluem açúcares e seus álcoois de açúcar correspondentes; um aminoácido tal como glutamato monossódico ou histidina; metilamina, tal como betaína; sal liotrópico, tal como sulfato de magnésio; poliol, tal como álcoois de açúcar tri-hídricos ou com peso molecular mais alto, tais como glicerina, dextran, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol; propileno glicol; polietileno glicol; Pluronics®; e suas combinações. Exemplos adicionais de lioprotetores incluem glicerina e gelatina e os açúcares melibiose, melezitose, rafinose, manotriose e estaquiose. Exemplos de açúcares redutores incluem glicose, maltose, lactose, maltulose, iso-maltulose e lactulose. Exemplos de açúcares não redutores incluem glicosídeos não redutores de compostos poli-hidróxi selecionados a partir de álcoois de açúcar e outros poliálcoois de cadeia linear. Os álcoois de açúcar preferidos são monoglicosídeos, especialmente os compostos obtidos através da redução de dissacarídeos, tais como lactose, maltose, lactulose e maltulose. O grupo lateral glicosídico pode ser glucosídico ou galactosídico. Exemplos adicionais de álcoois de açúcar são glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulose. O lioprotetor preferido são os açúcares não redutores trehalose ou sacarose.

O lioprotetor é adicionado à formulação previamente liofilizada em "quantidade lioprotetora", o que significa que, após a liofilização da proteína na presença da quantidade lioprotetora do lioprotetor, a proteína retém essencialmente a sua integridade e estabilidade físico-química mediante liofilização e armazenagem.

Ao preparar-se as formulações com viscosidade reduzida de

PI0403964

acordo com a presente invenção, dever-se-á tomar cuidado utilizando os excipientes enumerados acima, bem como outros aditivos, especialmente quando adicionados em alta concentração, e forma a não aumentar a viscosidade da formulação.

"Açúcar farmaceuticamente aceitável" é uma molécula que, quando combinada com proteína de ineresse, evita ou reduz significativamente a instabilidade física e/ou química da proteína durante a armazenagem. Quando a formulação destinar-se a liofilização e reconstituição em seguida, os "açúcares farmaceuticamente aceitáveis" podem também ser conhecidos como "lioprotetores". Exemplos de açúcares e seus álcoois de açúcar correspondentes incluem: um aminoácido, tal como glutamato monossódico ou histidina; metilamina, tal como betaína; sal liotrópico, tal como sulfato de magnésio; poliol, tal como álcoois de açúcar tri-hídricos ou de peso molecular mais alto, tais como glicerina, dextran, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol; propileno glicol; polietileno glicol; Pluronics® e suas combinações. Exemplos de lioprotetores adicionais incluem glicerina e gelatina e os açúcares melibiose, melezitose, rafinose, manotriose e estaquiose. Exemplos de açúcares redutores incluem glicose, maltose, lactose, maltulose, iso-maltulose e lactulose. Exemplos de açúcares não redutores incluem glicosídeos não redutores de compostos poli-hidróxi selecionados a partir de álcoois de açúcar e outros poliálcoois de cadeia linar. Os álcoois de açúcar preferidos são monoglicosídeos, especialmente os compostos obtidos através da redução de dissacarídeos tais como lactose, maltose, lactulose e maltulose. O grupo lateral glicosídico pode ser glucosídico ou galactosídico. Exemplos adicionais de álcoois de açúcar são glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulose. Os açúcares farmaceuticamente aceitáveis preferidos são os açúcares não redutores trehalose ou sacarose.

Açúcares farmaceuticamente aceitáveis são adicionados à

PI0403964

36

formulação em "quantidade protetora" (tal como liofilização prévia), o que significa que a proteína retém essencialmente a sua integridade e estabilidade físico-química durante a armazenagem (tal como após a reconstituição e armazenagem).

O "diluente" de interesse no presente é aquele que é farmaceuticamente aceitável (seguro e não tóxico para administração a seres humanos) e é útil para a preparação de formulação líquida, tal como formulação reconstituída após a liofilização. Exemplos de diluentes incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (BWFI), solução tamponada por pH (tal como solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose. Em realização alternativa, os diluentes podem incluir soluções aquosas de sais e/ou tampões.

"Conservante" é um composto que pode ser adicionado às formulações do presente para reduzir a atividade bacteriana. A adição de conservante pode facilitar, por exemplo, a produção de formulação de múltiplo uso (múltipla dosagem). Exemplos de conservantes potenciais incluem cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio (mistura de cloretos de alquilbenzildimetilamônio em que os grupos alquila são compostos de cadeia longa) e cloreto de benzetônio. Outros tipos de conservantes incluem álcoois aromáticos tais como álcool fenólico, butílico e benzílico, alquil parabens tais como metil ou propil paraben, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e *m*-cresol. O conservante de maior preferência no presente é álcool benzílico.

"Tratamento" designa o tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Os necessitados de tratamento incluem aqueles que já possuem a disfunção, bem como aqueles em que a disfunção deve ser evitada.

"Mamífero", para os propósitos de tratamento, designa qualquer

PI0403964

animal classificado como mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de fazenda e animais de zoológico, esportivos ou de estimação, tais como cães, coelhos, bois, porcos, hamsters, outros roedores, camundongos, furões, ratos, gatos etc. Preferencialmente, o mamífero é ser humano.

"Disfunção" é qualquer condição que se beneficiaria do tratamento com a proteína. Esta inclui disfunções ou doenças agudas e crônicas, que incluem as condições patológicas que predispõem o mamífero à disfunção em questão. Exemplos não limitadores de disfunções a serem tratadas no presente incluem carcinomas e alergias.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" é pelo menos a concentração mínima necessária para efetuar melhoria mensurável ou prevenção de disfunção específica. Quantidades terapeuticamente eficazes de proteínas conhecidas são bem conhecidas na técnica, enquanto as quantidades eficazes de proteínas descobertas a seguir podem ser determinadas através de técnicas padrão que se encontram bem dentro do conhecimento dos técnicos no assunto, tais como médicos comuns.

"Viscosidade", da forma utilizada no presente, pode ser "viscosidade cinemática" ou "viscosidade absoluta". "Viscosidade cinemática" é medida do fluxo resistivo de um fluido sob a influência da gravidade. Quando dois fluidos com igual volume são colocados em viscômetros capilares idênticos e mantidos em fluxo por gravidade, um fluido viscoso leva mais tempo que um fluido menos viscoso para fluir através do capilar. Se um fluido levar 200 segundos para completar o seu fluxo e outro fluido levar 400 segundos, o segundo fluido é duas vezes mais viscoso que o primeiro em escala de viscosidade cinemática. "Viscosidade absoluta", às vezes denominada viscosidade simples ou dinâmica, é o produto da viscosidade cinemática e a densidade do fluido:

PI0403964

38

Viscosidade absoluta = viscosidade cinemática x densidade

A dimensão da viscosidade cinemática é L^2/T, em que L é comprimento e T é tempo. Comumente, a viscosidade cinemática é expressa em centistokes (cSt). A unidade SI de viscosidade cinemática é mm^2/s, que é de 1 cSt. A viscosidade absoluta é expressa em unidades de centipoise (cP). A unidade SI de viscosidade absoluta é o miliPascal-segundo (mPa-s), em que 1 cP = 1 mPa-s.

"Anti-histamina", da forma utilizada no presente, é um agente que antagoniza o efeito fisiológico da histamina. A ligação de histamina aos seus receptores H_1 e H_2 resulta em sintomas alérgicos característicos e efeitos ou coceira, vermelhidão, inchaço etc. Muitas anti-histaminas agem através do bloqueio da ligação de histamina aos seus receptores H_1 e H_2; entretanto, acredita-se que outras operem através da inibição da liberação de histamina. Exemplos de anti-histaminas são clorfeniramina, difenidramina, prometazina, cromolin sódio, astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, cloridrato de cetirizina, fumarato de clemastina, cloridrato de ciproheptadina, maleato de dexbronfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenidrinato, cloridrato de difenidramina, succinato de doxilamina, cloridrato de fexofendadina, cloridrato de terfenadina, cloridrato de hidrozina, loratidina, cloridrato de meclizina, citrato de tripelanamina, cloridrato de tripelenamina e cloridrato de triprolidina.

"Bronquiodilatador", da forma utilizada no presente, descreve agentes que antagonizam ou revertem a bronquioconstrição, evento fisiológico que ocorre tipicamente em reações asmáticas de fase inicial, resultando em redução da capacidade pulmonar e dificuldades de respiração. Exemplos de bronquiodilatadores incluem epinefrina, alfa e beta-adrenérgico de ação ampla, e os beta-adrenérgicos albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol e isoetarina. A bronquiodilatação pode também ser atingida através da

PI0402964

administração de xantinas, que incluem aminofilina e teofilina.

"Glucocorticóide", da forma utilizada no presente, descreve agentes com base esteroidal que possuem atividade antiinflamatória. Glucocorticóides são comumente utilizados para atenuar reação asmática de fase final. Exemplos de glucocorticóides incluem prednisona, dipropionato de beclometasona, triancinolona acetonida, flunisolida, betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, predinosolona, prednisona e triamcinolona.

"Droga antiinflamatória não esteroidal" ou "NSAID", da forma utilizada no presente, descreve agentes que possuem atividade antiinflamatória que não são baseados em esteroidal. Exemplos de NSAIDs incluem acetaminofen, aspirina, bromfenac sódio, diclofenac sódio, diflunisal, etodolac, fenoprofen cálcio, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, cetoprofen, meclofenamato sódio, ácido mefenâmico, nabumetona, naproxen, naproxen sódio, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac e tolmetin sódio.

II. Modos de Condução da Invenção:

A. Preparação de Polipeptídeos e Anticorpos:

A descrição a seguir refere-se principalmente à produção dos polipeptídeos ou anticorpos descritos no presente através do cultivo de células transformads ou transfectadas com um vetor que contém ácido nucleico que o codifica e purificação da proteína ou anticorpo resultante. Naturalmente, contempla-se que métodos alternativos, que são bem conhecidos na técnica, podem ser empregados para a preparação desses polipeptídeos ou anticorpos. Essas seqüências ou suas porções podem ser produzidas, por exemplo, através de síntese direta de peptídeos utilizando técnicas de fase sólida (vide, por exemplo, Stewart et al, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., São Francisco CA, Estados Unidos (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:

PI0402864 40

2149-2154 (1963)). A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada através do uso de técnicas manuais ou de automação. A síntese automatizada pode ser conseguida, por exemplo, através do uso de um Sintetizador de Peptídeos da Applied Byosistems (Foster City CA, Estados Unidos), utilizando as instruções do fabricante. Várias porções das proteínas ou anticorpos descritos no presente podem ser sintetizadas quimicamente de forma separada e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos.

1. ISOLAMENTO DE DNA QUE CODIFICA AS PROTEÍNAS DESCRITAS NO PRESENTE:

DNA codificador das proteínas descritas no presente pode ser obtido a partir de biblioteca de cDNA preparada a partir de tecido que se acredita possuir o mRNA correspondente e expressá-la em nível detectável. Conseqüentemente, esse DNA codificador de proteínas humanas pode ser convenientemente obtido a partir de biblioteca de cDNA preparada a partir de tecido humano, tal como descrito nos Exemplos. O gene codificador de proteína pode também ser obtido a partir de biblioteca genômica ou de procedimentos sintéticos conhecidos (tais como síntese de ácido nucleico automatizada).

As bibliotecas podem ser selecionadas com sondas (tais como oligonucleotídeos com pelo menos cerca de 20 a 80 bases) projetadas para identificar o gene de interesse. A seleção da biblioteca genômica ou de cDNA com a sonda selecionada pode ser conduzida através do uso de procedimentos padrão, tais como os descritos em Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nova Iorque, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Meio alternativo de isolar o gene que codifica o gene desejado é o uso de metodologia PCR (Sambrook et al, acima; Dieffenbach et al, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

Os Exemplos abaixo descrevem métodos de seleção de biblioteca

PI0409864

de cDNA. As seqüências de oligonucleotídeos selecionadas como sondas deverão possuir comprimento suficiente e ser suficientemente não ambíguas para que os falsos positivos sejam minimizados. O oligonucleotídeo é preferencialmente marcado de tal forma que possa ser detectado mediante hibridização em DNA na biblioteca sendo selecionada. Métodos de marcação são bem conhecidos na técnica e incluem o uso de radiomarcas como ATP ^{32}P-marcado, biotinilação ou marcação com enzimas. As condições de hibridização, que incluem estringência moderada e alta estringência, são fornecidas em Sambrook et al, acima.

As seqüências identificadas nesses métodos de seleção de bibliotecas podem ser comparadas e alinhadas com outras seqüências conhecidas depositadas e disponíveis em bancos de dados públicos, tais como Genbank ou outros bancos de dados de seqüências privados. A identidade de seqüências (em nível de nucleotídeo ou de aminoácido) em regiões definidas da molécula ou através da seqüência de comprimento total pode ser determinada através do uso de métodos conhecidos na técnica e conforme descrito no presente.

Seqüência de codificação de proteínas que contém ácido nucleico pode ser obtida através de seleção de bibliotecas genômicas ou de cDNA selecionadas, utilizando a seqüência de aminoácido deduzida descrita no presente pela primeira vez e, se necessário, utilizando procedimentos de extensão de primers convencionais conforme descrito em Sambrook et al, acima, para detectar precursores e intermediários de processamento de mRNA que podem não haver sido transcritos em reverso em cDNA.

2. SELEÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS:

As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vetores de clonagem ou de expressão que contêm as proteínas ou os anticorpos descritos no presente para produção e cultivadas em meios

PI0403964

42

nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformadores ou amplificação dos genes que codificam as seqüências desejadas. As condições de cultivo, tais como meios, temperatura, pH e similares, podem ser selecionadas pelos técnicos no assunto sem experimentação indevida. De forma geral, os princípios, protocolos e técnicas práticas de maximização da produtividade dos cultivos celulares podem ser encontrados em *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook et al, acima.

Métodos de transfecção de células eucarióticas e transformação de células procarióticas são conhecidos dos técnicos comuns no assunto, tais como $CaCl_2$, $CaPO_4$, mediados por lipossomos e eletroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando técnicas padrão apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, conforme descrito em Sambrook et al, acima, ou eletroporação geralmente é utilizado para procariotes. Infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para a transformação de certas células vegetais, conforme descrito por Shaw et al, *Gene*, 23: 315 (1983) e no documento WO 89/05859, publicada em 29 de junho de 1989. Para células de mamíferos sem essas paredes celulares, pode ser empregado o método de precipitação de fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Aspectos gerais de transfecções de sistema de hospedeiro celular de mamíferos foram descritos na Patente Norte-Americana nº 4.399.216. Transformações em levedura são tipicamente conduzidas de acordo com o método de Van Solingen et al, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) e Hsiao et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, 76: 3829 (1979). Entretanto, outros métodos de introdução de DNA em células, tais como através de microinjeção nuclear, eletroporação, fusão de protoplastas bacterianos com células intactas ou policátions, tais como polibreno e poliornitina, podem também ser utilizados.

PI0403964

43

Para várias técnicas de transformação de células de mamíferos, vide Keown et al, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) e Mansour et al, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Células hospedeiras apropriadas para clonagem ou expressão do DNA nos vetores do presente incluem células procarióticas, de leveduras ou eucarióticas superiores. Os procariotes apropriados incluem, mas sem limitar-se a eubactérias, tais como organismos grama-negativos ou grama-positivos, tais como enterobactérias como *E. coli*. Várias linhagens de *E. coli* são disponíveis para o público, tais como linhagem MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); linhagem W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) e K5 772 (ATCC 53.635). Outras células hospedeiras procarióticas apropriadas incluem enterobactérias tais como *Escherichia*, como *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, como *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, tal como *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli*, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (como *B. licheniformis* 41P descrita na Patente Alemã nº DD 266.710, publicada em doze de abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos e não limitadores. A linhagem W3110 é um hospedeiro ou hospedeiro parental particularmente preferido, pois é uma linhagem hospedeira comum para fermentações de produto de DNA recombinante. Preferencialmente, a célula hospedeira segrega quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. A linhagem W3110 pode ser modificada, por exemplo, para efetuar mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas para o hospedeiro, com exemplos desses hospedeiros incluindo *E. coli* W3110 linhagem 1A2, que contém o genótipo completo *tonA*; linhagem 9E4 de *E. coli* W3110, que contém o genótipo completo *tonA ptr3*; linhagem 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que contém o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan*^{r}; linhagem 37D6 de *E. coli* W3110,

PI0403964

que contém o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; linhagem 40B4 de *E. coli* W3110, que é linhagem 37D6 com mutação de deleção *degP* não resistente a canamicina; e linhagem *E. coli* que contém protease periplásmica mutante descrita na Patente US 4.946.783, emitida em sete de agosto de 1990. Alternativamente, são apropriados métodos *in vitro* de clonagem, tais como PCR ou outras reações de polimerase de ácidos nucleicos.

Além de procariotes, micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros de expressão ou de clonagem apropridaos para vetores que codificam as proteínas ou anticorpos descritos no presente. *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo hospedeiro eucariótico inferior comumente utilizado. Outros incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Beach e Nurse, *Nature* 290: 140 (1981); Patente EP 139.383, publicada em dois de maio de 1985); hospedeiros *Kluyveromyces* (Patente US 4.943.529; Fleer et al, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)), tais como *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al, *J. Bacteriol.*, 154 (2): 737-42 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al, *Bio/Technology* 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* e *K. marxianus; yarrowia* (Patente EP 402.226); *Pichia pastoris* (Patente EP 183.070; Sreekrishna et al, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Patente EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces*, tais como *Schwanniomyces occidentalis* (Patente EP 394.538, publicada em 31 de outubro de 1990); e fungos filamentosos, tais como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357, publicada em dez de janeiro de 1991) e hospedeiros *Aspergillus*, tais como *A. nidulans* (Ballance et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 (1983); Tilburn et al, *Gene*,

PI0403964

26: 205-221 (1983); Yelton et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 1470-1474 (1984)) e *A. niger* (Kelly e Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 (1985)). Leveduras metilotrópicas são apropriadas no presente e incluem, mas sem limitar-se a levedura capaz de crescimento sobre metanol selecionada a partir dos gêneros que consistem de *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Rhodotorula*. Relação de espécies específicas que são exemplos desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

As células hospedeiras apropriadas para a expressão de forma glicosilada dos polipeptídeos e anticorpos descritos no presente são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de insetos, tais como Drosophila S23 e Spodoptera Sf9, bem como células vegetais. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis incluem células COS e de ovário de hamster chinês (CHO). Exemplos mais específicos incluem linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultivo de suspensão, Graham et al, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovário de hamster chinês/DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4216 (1980)); células sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); e tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51). Considera-se que a seleção da célula hospedeira apropriada encontra-se dentro do conhecimento da técnica.

3. Seleção e Uso de Vetor Replicável:

O ácido nucleico (tal como cDNA ou DNA genômico) que codifica os polipeptídeos e anticorpos descritos no presente podem ser inseridos em um vetor que pode ser reproduzido para clonagem (amplificação do DNA) ou

PI0403864

para expressão. Vários vetores são disponíveis ao público. O vetor pode estar presente, por exemplo, na forma de plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A seqüência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vetor através de uma série de procedimentos. De forma geral, DNA é inserido em um ou mais locais de endonuclease de restrição apropriados, utilizando métodos conhecidos na técnica. Os componentes de vetor geralmente incluem, mas sem limitar-se a um ou mais dentre uma seqüência de sinal, origem de reprodução, um ou mais genes marcadores, elemento amplificador, promotor e seqüência de término de transcrição. A construção de vetores apropriados que contenham um ou mais destes componentes emprega métodos de ligação padrão que são conhecidos do técnico no assunto.

A produção recombinante dos polipeptídeos ou anticorpos pode ser atingida não apenas diretamente, mas também na forma de polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo. A parte heteróloga pode ser uma seqüência de sinal ou outro polipeptídeo que possui local de divisão específico no terminal N do polipeptídeo ou proteína madura. De forma geral, a seqüência de sinal pode ser um componente do vetor ou pode ser uma parte do DNA que codifica o polipeptídeo ou anticorpo que é inserido no vetor. A seqüência de sinal pode ser uma seqüência de sinal procariótica selecionada, por exemplo, a partir do grupo de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou líderes de enterotoxina II estáveis a quente. Para a secreção de leveduras, a seqüência de sinal pode ser, por exemplo, o líder invertase de levedura, líder fator alfa (incluindo líderes de fator α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, este último descrito na Patente US 5.010.182), ou líder de fosfatase ácida, o líder de glucoamilase de *C. albicans* (Patente EP 362.179, publicada em quatro de abril de 1990), ou o sinal descrito no documento WO 90/13646, publicada em quinze de novembro de 1990. Em expressão de células de mamíferos, podem ser utilizadas seqüências de sinais de mamíferos para dirigir a secreção da proteína, tais

PI0403964

como seqüências de sinais de polipeptídeos segregados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como líderes de secreção viral.

Tanto os vetores de clonagem como de expressão contêm uma seqüência de ácido nucleico que permite a reprodução do vetor em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Estas seqüências são bem conhecidas para uma série de bactérias, leveduras e vírus. A origem de reprodução do plasmídeo pBR322 é apropriada para a maior parte das bactérias gram-negativas, a origem de plasmídeo 2μ é apropriada para leveduras e várias origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para a clonagem de vetores em células de mamíferos.

Os vetores de clonagem e de expressão conterão tipicamente um gene de seleção, também denominado marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, tais como ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, tais como o gene que codifica D-alanino racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de marcadores selecionáveis apropriados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células competentes para a tomada da seqüência de DNA que codifica os polipeptídeos ou anticorpos descritos no presente, tais como DHFR ou timidino quinase. Uma célula hospedeira apropriada ao empregar-se DHFR do tipo selvagem é a linhagem de células de CHO com deficiência na atividade de DHFR, preparadas e propagadas conforme descrito por Urlaub et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4216 (1980). Um gene de seleção apropriado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb et al, *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman et al, *Gene*, 7: 141 (1979); Tschemper et al, *Gene*, 10: 157 (1980)). O gene *trp1* fornece um marcador de

PI0403964

seleção para uma linhagem mutante de levedura que não possui a capacidade de crescimento em triptofano, tal como ATCC nº 44076 ou PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977)).

Os vetores de clonagem e de expressão normalmente contêm um promotor ligado operativamente a essas seqüências de DNA para dirigir a síntese de mRNA. Promotores reconhecidos por uma série de células hospedeiras potenciais são bem conhecidos. Promotores apropriados para uso com hospedeiros procarióticos incluem os sistemas promotores de β-lactamase e lactose (Chang et al, *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al, *Nature*, 281: 544 (1979)), fosfatase alcalina, sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980); Patente EP 36.776) e promotores híbridos, tais como o promotor tac (deBoer et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 21-25 (1983)). Os promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão uma seqüência Shine-Dalgarno (S. D.) ligada operativamente a essas seqüências de DNA.

Exemplos de seqüências promotoras apropriadas para uso com hospedeiros de leveduras incluem os promotores para 3-fosfoglicerato quinase (Hitzeman et al, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)) ou outras enzimas glicolíticas (Hess et al, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)), tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase e glucoquinase.

Outros promotores de leveduras, que são promotores indutíveis que possuem a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradantes associadas ao metabolismo de nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato

PI0402964

desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vetores e promotores apropriados para uso na expressão de leveduras são adicionalmente descritos na Patente EP 73.657.

A transcrição de vetores em células hospedeiras de mamíferos pode ser controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus de polioma, vírus da catapora (Patente UK 2.211.504, publicada em cinco de julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus sarcoma das aves, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus dos Símios 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, tais como o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, a partir de promotores de choque por aquecimento, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

A transcrição de ácido nucleico codificador do polipeptídeos e anticorpos do presente por eucariotes superiores pode ser aumentada pela inserção de uma seqüência amplificadora no vetor. Os amplificadores são elementos que agem como cis de DNA, normalmente cerca de 10 a 300 bp, que atuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. Diversas seqüências amplificadoras são agora conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α-fetoproteína e insulina). Tipicamente, entretanto, utilizar-se-á um amplificador de um vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o amplificador SV40 no lado posterior da origem de reprodução (bp 100-270), o amplificador promotor precoce de citomegalovírus, o amplificador de polioma sobre o lado posterior da origem de reprodução e amplificadores de adenovírus. O amplificador pode ser dividido no vetor em posição a 5' ou 3' do DNA para a seqüência de codificação, mas é preferencialmente localizado em local a 5' do promotor.

Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de leveduras, fungos, insetos, plantas, animais, seres

PI0403964

humanos ou nucleadas a partir de outros organismos multicelulares) também conterão seqüências necessárias para o término de transcrição e estabilização do mRNA. Essas seqüências são comumente disponíveis a partir das regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3' de cDNAs ou DNAs virais ou eucarióticos. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do mRNA codificador dos polipeptídeos ou anticorpos descritos no presente.

Ainda outros métodos, vetores e células hospedeiras apropriadas para adaptação à síntese do polipeptídeo ou anticorpos descritos no presente no cultivo de células de vertebrados recombinantes encontram-se descritos em Gething et al, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei et al, *Nature*, 281: 40-46 (1979); Patente EP 117.060; e Patente EP 117.058.

4. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO/AMPLIFICAÇÃO GENÉTICA:

A expressão e/ou amplificação genética pode ser medida diretamente em uma amostra, através, por exemplo, de Southern Blot convencional, Northern Blot para quantificar a transcrição de mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 5201-5205 (1980)), Dot Blot (análise de DNA) ou hibridização *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas seqüências fornecidas no presente. Alternativamente, podem ser empregados anticorpos que possam reconhecer duplex específicos, incluindo duplex de DNA, duplex de RNA e duplex híbridos de DNA-RNA ou duplex de DNA-proteína. Os anticorpos, por sua vez, podem ser marcados e o teste pode ser conduzido quando o duplex for ligado a uma superfície, de forma que, mediante a formação de duplex sobre a superfície, a presença de anticorpo unido ao duplex possa ser detectada.

Alternativamente, a expressão genética pode ser medida através de métodos imunológicos, tais como manchas imunohistoquímicas de células ou seções de tecidos e teste de cultivo celular ou fluidos do corpo, para

PI0403964

quantificar diretamente a expressão de produto genético. Anticorpos úteis para manchas imunohistoquímicas e/ou teste de amostras de fluidos podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra os polipeptídeos descritos no presente ou contra um peptídeo sintético com base nas seqüências de DNA fornecidas no presente ou contra seqüências exógenas fundidas a DNA codificador desses polipeptídeos e anticorpos e codificar um epítopo de anticorpo específico.

5. PURIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS:

Formas deles podem ser recuperadas a partir de meio de cultivo ou de lisatos de células hospedeiras. Se for ligado por membrana, ele pode ser liberado da membrana através do uso de solução de detergente apropriada (tal como Triton-X 100) ou de divisão enzimática. As células empregadas na expressão dos polipeptídeos ou anticorpos descritos no presente podem ser rompidas através de vários meios físicos ou químicos, tais como ciclização de descongelamento/congelamento, sonicação, rompimento mecânico ou agentes de lise celular.

Pode-se desejar purificar os polipeptídeos ou anticorpos descritos no presente a partir de proteínas celulares recombinantes ou outros polipeptídeos. Os procedimentos a seguir são exemplos de procedimentos de purificação apropriados: através de fracionamento sobre coluna de troca de íons; precipitação em etanol; HPLC de fase reversa; cromatografia sobre sílica ou resina de troca de cátions, tal como DEAE; cromatoconcentração; SDS-PAGE; precipitação em sulfato de amônio; filtragem de gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas de proteína A Sepharose para remover contaminantes tais como IgG; e colunas quelantes metálicas para ligar formas marcadas por epítopos do polipeptídeo ou anticorpo. Vários métodos de purificação de proteínas podem ser empregados e esses métodos são

PI0403964

conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nova Iorque, Estados Unidos (1982). A(s) etapa(s) de purificação selecionada(s) dependerá(ão), por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do polipeptídeo ou anticorpo específico produzido.

B. PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS:

Em certas realizações da presente invenção, a proteína selecionada é um anticorpo. Seguem-se técnicas de produção de anticorpos, que incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

1. ANTICORPOS POLICLONAIS:

Os anticorpos policlonais são geralmente elevados em animais através de diversas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína que seja imunogênica na espécie a ser imunizada, tal como hemocianina de conchas (KLH), albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, utilizando agente bifuncional ou derivatizante, tal como éster maleimidobenzoil sufossuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, $SOCl_2$ ou $R^1N=C=NR$, em que R e R^1 são independentemente grupos alquila inferiores. Exemplos de adjuvantes que podem ser empregados incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil lipídio A, trehalose dicorinomicolato sintético). O protocolo de imunização pode ser selecionado pelos técnicos no assunto sem experimentação indevida.

Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos ou derivados através da combinação, por exemplo, de 100 μg ou

PI0404964

5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com três volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução de forma intradérmica em diversos locais. Um mês mais tarde, os animais são incentivados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund, através de injeção subcutânea em diversos locais. Sete a 14 dias mais tarde, os animais são sangrados e o soro é testado para titulagem de anticorpos. Os animais são incentivados até a estabilização do título. Os conjugados também podem ser fabricados em cultivo celular recombinante, na forma de fusões de proteínas. Além disso, agentes agregantes tais como alúmen são apropriadamente utilizados para aumentar a reação imunológica.

2. ANTICORPOS MONOCLONAIS:

Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural e/ou modificações pós-tradução (tais como isomerizações e amidações) que podem estar presentes em pequenas quantidades. Desta forma, o adjetivo "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo mistura de anticorpos discretos.

Os anticorpos monoclonais podem ser fabricados, por exemplo, através da utilização do método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al, *Nature* 256: 495 (1975) ou podem ser fabricados através de métodos de DNA recombinantes (Patente US 4.816.567).

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, é imunizado na forma descrita acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se liguem especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são

PI0403964

fundidos em seguida com células de mieloma, utilizando um agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59 a 103 (Academic Press, 1986)).

O agente imunizador incluirá tipicamente a proteína antigênica ou uma de suas variantes de fusão. Geralmente, são utilizados linfócitos do sangue periférico ("PBLs") caso sejam desejadas células de origem humana, ou células do baço ou células do nódulo linfático são utilizadas caso sejam desejadas fontes de mamíferos não humanos. Os linfócitos são fundidos em seguida com uma linhagem de células imortalizadas, utilizando um agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), págs. 59-103.

Linhagens de células imortalizadas são normalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origem humana, bovina e de roedores. Normalmente, são empregadas linhagens de células de mieloma de rato ou camundongo. As células de hibridoma preparadas desta forma são semeadas e cultivadas em meio de cultivo apropriado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Caso as células de mieloma parentais não contenham a enzima hipoxantino guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), por exemplo, o meio de cultivo seletivo para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

As células de mieloma imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis

PI0403964

a um meio seletivo tal como meio HAT. Dentre estas, são preferidas as linhagens de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis através do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e células SP-2 (e seus derivados, tais como células X63-Ag8-653) disponíveis através da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos, Manassus, Virgínia, Estados Unidos. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano/de camundongos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); e Brodeur et al, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51 a 63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Estados Unidos, 1987)).

O meio de cultivo em que são cultivadas células de hibridoma é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou de um teste de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou teste imunoabsorvente ligado por enzimas (ELISA).

O meio de cultivo no qual as células de hibridoma são cultivadas pode ser testado para determinar a presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno desejado. Preferencialmente, a afinidade e a especificidade de ligação do anticorpo monoclonal podem ser determinadas através de imunoprecipitação ou de teste de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou teste ligado por enzimas (ELISA). Estes métodos e testes são conhecidos na técnica. A afinidade de ligação pode ser determinada, por exemplo, através da análise de Scatchard descrita por Munson et al, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones

PI0403964

podem ser subclonados através da limitação de procedimentos de diluição e cultivados através de métodos padrão (Goding, acima). Meios de cultivo apropriados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores de ascite em mamíferos.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são apropriadamente separados do meio de cultivo, fluido de ascite ou soro através de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como proteína A Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos monoclonais podem também ser fabricados através de métodos de DNA recombinante, tais como os descritos na Patente US 4.816.567 e conforme descrito acima. O DNA codificador dos anticorpos monoclonais é facilmente isolado e seqüenciado através da utilização de procedimentos convencionais (utilizando-se, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que sejam capazes de ligar-se especificamente a genes codificadores das cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem de fonte preferida desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina, a fim de obter a síntese de anticorpos monoclonais nessas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de análise sobre a expressão recombinante em bactérias de DNA que codificam o anticorpo incluem Skerra et al, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) e Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

Em realização adicional, os anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos geradas utilizando as técnicas descritas

PI0403964

em McCafferty et al, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subseqüentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) através de mistura de cadeias (Marks et al, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), bem como infecções combinatórias e recombinação *in vivo*, como estratégia para a construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse et al, *Nucl. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Desta forma, essas técnicas são alternativas viáveis a técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O DNA pode também ser modificado, por exemplo, através da substituição da seqüência de codificação por domínios constantes de cadeia leve e cadeia pesada humanas em lugar das seqüências murinas homólogas (Patente US 4.816.567; e Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 6851 (1984)), ou através de ligação covalente à seqüência de codificação de imunoglobulinas com a seqüência de codificação para um polipeptídeo não de imunoglobulina, no todo ou em parte. Tipicamente, esses polipeptídeos não de imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de um anticorpo, ou são substituídos pelos domínios variáveis do local de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um local de combinação de antígenos que apresenta especificidade para um antígeno e outro local de combinação de antígenos que apresenta especificidade para um antígeno diferente.

Os anticorpos monoclonais descritos no presente podem ser monovalentes, cuja preparação é bem conhecida na técnica. Um método envolve, por exemplo, a expressão recombinante de cadeia leve de imunoglobulina e uma cadeia pesada modificada. A cadeia pesada é truncada

PI0403964

geralmente em qualquer ponto da região Fc, de forma a evitar retícula de cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes podem ser substituídos com outro resíduo de aminoácido ou são excluídos para evitar a retícula. Métodos *in vitro* também são apropriados para a preparação de anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, particularmente fragmentos Fab, pode ser obtida utilizando métodos rotineiros conhecidos na técnica.

Anticorpos quiméricos ou híbridos podem também ser preparados *in vitro*, utilizando métodos conhecidos na química de proteína sintética, que incluem aqueles que envolvem agentes reticulantes. Imunotoxinas, por exemplo, podem ser construídas utilizando reação de troca de dissulfeto ou através da formação de ligação de tioéter. Exemplos de reagentes apropriados para este propósito incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

3. ANTICORPOS HUMANIZADOS:

Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem compreender adicionalmente anticorpos humanos ou humanizados. Formas humanizadas de anticorpos não humanos (tais como murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ ou outras subseqüências de ligação de antígenos de anticorpos) que contêm seqüência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nas quais os resíduos de uma região de determinação de complementaridade (CDR) do paciente são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato ou coelho que possua a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos de cadeia principal de Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Anticorpos humanizados podem também

PI0403964

compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem nas seqüências de cadeia principal ou CDR importadas. De forma geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma seqüência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá idealmente pelo menos uma parte de região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Jones et al, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332: 323-329 (1988) e Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Métodos de humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica. Geralmente, um anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácidos não humanos são muitas vezes denominados resíduos "importados", que são simplesmente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), ou através da substituição de seqüências de CDR ou CDRs de roedores pelas seqüências correspondentes de um anticorpo humano. Conseqüentemente, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

PI0403964

60

A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na fabricação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de "melhor adequação", a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de seqüências de domínio variável humanas conhecidas. A seqüência humana que é mais próxima da do roedor é aceita em seguida como a estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Outro método utiliza uma estrutura específica derivada da seqüência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para diversos anticorpos humanizados diferentes (Carter et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 4285 (1992); Presta et al, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade de ligação para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das seqüências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das seqüências parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e familiares para os técnicos no assunto. São disponíveis programas de computador que ilustram e exibem prováveis estruturas de conformação tridimensional de possíveis seqüências de imunoglobulina selecionadas. A inspeção dessas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da possível seqüência de imunoglobulina, ou seja, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina possível ligar seu antígeno. Desta forma, os resíduos de FR

PI0403964

podem ser selecionados e combinados a partir das seqüências receptora e importada, de forma que seja atingida a característica desejada do anticorpo, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo. Geralmente, os resíduos da CDR são direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígenos.

São contempladas diversas formas do anticorpo humanizado. O anticorpo humanizado pode ser, por exemplo, um fragmento de anticorpo, tal como Fab, que é opcionalmente conjugado a um ou mais agentes citotóxicos, a fim de gerar um imunoconjugado. Alternativamente, o anticorpo humanizado pode ser um anticorpo intacto, tal como um anticorpo IgG1 intacto.

4. ANTICORPOS HUMANOS:

Como alternativa para a humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. É agora possível produzir, por exemplo, animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a deleção homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada de anticorpos (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem de gérmens resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linhagem de gérmen humano nesses camundongos com mutação da linhagem de gérmens resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio de antígenos. Vide, por exemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); Patente US 5.591.669 e documento WO 97/17852.

Alternativamente, pode-se utilizar tecnologia de exibição de fagos para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro* a partir

PI0403964

62

de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não imunizados (McCafferty et al, *Nature* 348: 552-553 (1990); Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991)). De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpos são clonados em estrutura em um gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentoso, tal como M13 ou fd, e exibidos na forma de fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita única do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene codificador do anticorpo que exibe essas propriedades. Desta forma, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição de fago pode ser realizada em uma série de formatos, analisados, por exemplo, por Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição do fago. Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) isolaram um conjunto diverso de anticorpos anti-oxazolona a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados de baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um conjunto diverso de antígenos (incluindo auto-antígenos) podem ser isolados seguindo-se essencialmente as técnicas descritas por Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou Griffith et al, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Vide também as Patentes US 5.565.332 e US 5.573.905.

As técnicas de Cole et al e Boerner et al também são disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) e Boerner et al, *J. Immunol.* 147 (1): 86-95 (1991). De forma similar, anticorpos humanos podem ser elaborados através da introdução de locais de imunoglobulina humana em

PI0403964

animais transgênicos, tais como camundongos nos quais os genes de imunoglobulina endógenos foram completa ou parcialmente desativados. Mediante desafio, observa-se a produção de anticorpos humanos, que relembram de perto os observados em seres humanos em todos os aspectos, incluindo a redisposição genética, montagem e repertório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes US 5.545.807, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016 e nas publicações científicas a seguir: Marks et al, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild et al, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Por fim, anticorpos humanos podem também ser gerados *in vitro* por células B ativadas *in vitro* (vide as Patentes US 5.567.610 e US 5.229.275).

5. FRAGMENTOS DE ANTICORPOS:

Em certas circunstâncias, existem vantagens na utilização de fragmentos de anticorpos, e não anticorpos inteiros. O menor tamanho dos fragmentos permite liberação rápida e pode gerar maior acesso a tumores sólidos.

Foram desenvolvidas diversas técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, esses fragmentos foram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto et al, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24: 107-117 (1992); e Brennan et al, *Science* 229: 81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Fragmentos de anticorpos Fab, Fv e scFv podem ser expressos em *E. coli* e dele segregados, de forma a permitir a produção fluente de grandes quantidades desses fragmentos. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das

PI0403964

bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, fragmentos de Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter et al, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos de $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente a partir do cultivo de células hospedeiras recombinantes. Fab e F(ab')2 com maior meia-vida *in vivo* que compreendem resíduos de epítopos de ligação de receptores de recuperação são descritos na Patente US 5.869.046. Em outras realizações, o anticorpo selecionado é um fragmento de Fv de fita única (scFv). Vide o documento WO 93/16185; Patente US 5.571.894; e Patente US 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser um "anticorpo linear", conforme descrito, por exemplo, na Patente US 5.641.870. Esses fragmentos de anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

6. Terapia com Pró-Drogas Mediada por Enzimas Dependentes de Anticorpos (ADEPT):

Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem também ser utilizados em ADEPT através da conjugação do anticorpo a uma enzima ativadora de pró-drogas que converte uma pró-droga (tal como agente quimioterapêutico de peptidila, vide o documento WO 81/01145) em uma droga anti-câncer ativa. Vide, por exemplo, o documento WO 88/07378 e a Patente US 4.975.278.

O componente de enzima do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de agir sobre uma pró-droga, de forma tal a convertê-la na sua forma citotóxica mais ativa.

As enzimas que são úteis no método de acordo com a presente invenção incluem, mas sem limitar-se a glicosidase, glicose oxidase, lisozima humana, glucuronidase humana, fosfatase alcalina útil para a conversão de pró-drogas que contêm fosfato em drogas livres; arilsulfatase útil para a

PI0403964

conversão de pró-drogas que contêm sulfato em drogas livres; citosino desaminase útil para a conversão de 5-fluorocitosina não tóxica na droga anti-câncer 5-fluorouracila; proteases, tais como serratia protease, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases (tais como carboxipeptidase G2 e carboxipeptidase A) e catepsinas (tais como catepsinas B e L) que são úteis para a conversão de pró-drogas que contêm peptídeos em drogas livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para a conversão de pró-drogas que contêm substituintes D-aminoácidos; enzimas que dividem carboidrato, tais como β-galactosidase e neuraminidase úteis para a conversão de pró-drogas glicosiladas em drogas livres; β-lactamase útil para a conversão de drogas derivadas com β-lactamas em drogas livres; e penicilino amidases, tais como penicilino vamidase ou penicilino G amidase, úteis para a conversão de drogas derivadas nos seus nitrogênios amina com grupos fenoxiacetila ou fenilacetila, respectivamente, em drogas livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser utilizados para converter as pró-drogas de acordo com a presente invenção em drogas ativas livres (vide, por exemplo, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Conjugados de anticorpos e abzimas podem ser preparados conforme descrito no presente para o fornecimento da abzima a uma população de células tumorosas.

As enzimas acima podem ser ligadas covalentemente ao polipeptídeo ou anticorpos descritos no presente através de métodos bem conhecidos na técnica, tais como o uso dos agentes reticulantes heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, proteínas de fusão que compreendem pelo menos a região de ligação de antígenos do anticorpo de acordo com a presente invenção ligadas a pelo menos uma parte funcionalmente ativa de uma enzima de acordo com a presente invneção podem ser construídas utilizando métodos de DNA recombinantes bem

PI0403964

conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Neuberger et al, *Nature* 312: 604-608 (1984)).

7. ANTICORPOS BIESPECÍFICOS E POLIESPECÍFICOS:

Os anticorpos biespecíficos (BsAbs) são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois epítopos diferentes, que incluem os que se encontram na mesma ou em outra proteína. Alternativamente, um braço pode ser armado para ligar-se ao antígeno alvo e outro braço pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula acionadora sobre um leucócito, tal como uma molécula receptora de células T (tal como CD3) ou receptores de Fc para IgG (FcγR), tais como FcγR1 (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), de forma a concentrar e localizar mecanismos de defesa celular para a célula que expressa antígenos alvo. Estes anticorpos podem ser derivados de anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (tais como anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para células que expressem o antígeno alvo. Esses anticorpos possuem um braço que liga o antígeno desejado e outro braço que liga o agente citotóxico (tal como saporina, anti-interferon-a, vinca alcolóide, cadeia A rícina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Exemplos de anticorpos biespecíficos conhecidos incluem anti-ErbB2/anti-FcgRIII (documento WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-FcgRI (Patente US 5.837.234), anti-ErbB2/anti-CD3 (Patente US 5.821.337).

Métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total baseia-se na coexpressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Millstein et al, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Devido à disposição aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses

PI0403964

hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é normalmente realizada através de etapas de cromatografia de afinidade, é um tanto problemática e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são descritos no documento WO 93/08829 e em Traunecker et al, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

De acordo com abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação de antígenos e anticorpos) são fundidos a seqüências de domínio constante de imunoglobulina. Preferencialmente, a fusão efetua-se com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de articulação, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1), que contém o local necessário para ligação de cadeias leves, presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs codificadores das fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina são inseridos em vetores de expressão separados e cotransfectados em um organismo hospedeiro apropriado. Isso proporciona grande flexibilidade de ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeos em realizações em que razões desiguais das três cadeias de polipeptídeos utilizadas na construção proporcionam os rendimentos ideais. É possível, entretanto, inserir as seqüências de codificação de duas ou de todas as três cadeias de polipeptídeos em um único vetor de expressão, quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeos em razões iguais resultar em altos rendimentos ou quando as razões não possuírem significado específico.

Em realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida

PI0402964

com primeira especificidade de ligação em um braço e um par de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (que proporciona segunda especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que essa estrutura assimétrica possibilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade das moléculas biespecíficas proporciona forma fácil de separação. Esta abordagem é descrita no documento WO 94/04690. Para detalhes adicionais de geração de anticorpos biespecíficos, vide, por exemplo, Suresh et al, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita no documento WO 96/27011 ou na Patente US 5.731.168, a superfície intermediária entre um par de moléculas de anticorpos pode ser construída de forma a maximizar o percentual de heterodímeros que é recuperado do cultivo de células recombinantes. A superfície intermediária preferida compreende pelo menos uma parte da regão CH3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenos da superfície intermediária da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (tais como tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas sobre a superfície intermediária da segunda molécula de anticorpo, através da substituição de grandes cadeias laterais de aminoácidos com cadeias menores (tais como alanina ou treonina). Isso proporciona um mecanismo de aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

As técnicas de geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram descritas na literatura. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados, por exemplo, através da utilização de ligações

PI0403964

químicas. Brennan et al, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são divididos proteoliticamente para gerar fragmentos de $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente formador de complexo de ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vizinhos e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos de Fab' gerados são convertidos em seguida em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é então novamente convertido no derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo específico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados na forma de agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Fragmentos de Fab' podem ser recuperados diretamente a partir de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby et al, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula $F(ab')_2$ de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento de Fab' foi s[redacted] separadamente *E. coli* e submetido

PI0403964

oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993) forneceu mecanismo alternativo para a fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos/bivalentes. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Conseqüentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar-se com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, de maneira a formar dois locais de ligação de antígenos. Outra estratégia de fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos/bivalentes através da utilização de dímeros Fv de fita única (sFv) também foi relatada. Vide Gruber et al, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

São contemplados anticorpos com mais de duas valências. Podem ser preparados, por exemplo, anticorpos triespecíficos. Tutt et al, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Exemplos de anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítopos diferentes sobre uma dada molécula. Alternativamente, um braço antiproteína pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula acionadora sobre um leucócito, tal como uma molécula receptora de células T (tal como CD2, CD3, CD28 ou B7) ou receptores de Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), de forma a concentrar mecanismos de defesa celular para a célula que expressa a proteína específica. Anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para células que expressem uma proteína específica. Esses anticorpos possuem um braço de ligação de proteína e um braço que liga um agente citotóxico ou quelante de radionucleto, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA ou TETA. Outro anticorpo biespecífico de interesse liga a

PI0403964

proteína de interesse e liga adicionalmente o fator de tecido (TF).

6. Anticorpos Heteroconjugados:

Anticorpos heteroconjugados também se encontram dentro do escopo da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos ligados covalentemente. Um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado, por exemplo, a avidina e o outro a biotina. Propôs-se que esses anticorpos dirigissem, por exemplo, células do sistema imunológico a células indesejadas, na Patente US 4.676.980, e para o tratamento de infecções com HIV, nos documentos WO 91/00360 e WO 92/200373 e na Patente EP 0308936. Contempla-se que os anticorpos podem ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos na química de proteínas sintéticas, incluindo os que envolvem agentes reticulantes. Imunotoxinas, por exemplo, podem ser construídas utilizando reação de troca de dissulfeto ou através da formação de ligação de tioéter. Exemplos de reagentes apropriados para este propósito incluem iminotiolato e 4-mercaptobutirimidato de metila e os descritos, por exemplo, na Patente US 4.676.980. Anticorpos heteroconjugados podem ser elaborados utilizando qualquer método reticulante conveniente. Agentes reticulantes apropriados são bem conhecidos na técnica e descritos na Patente US 4.676.980, junto com uma série de técnicas de retícula.

7. Elaboração da Função Efetora:

Pode ser desejável modificar o anticorpo de acordo com a presente invenção com relação à função efetora, de forma a aumentar a eficácia do anticorpo no tratamento de câncer. Resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, por exemplo, de forma a permitir a formação de ligações de dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico gerado desta forma pode apresentar maior capacidade de internalização e/ou maior morte celular mediada por complemento e citotoxicidade celular

PI0403964

dependente de anticorpos (ADCC). Vide Caron et al, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com maior atividade antitumores podem também ser preparados através do uso de reticulantes heterobifuncionais, conforme descrito em Wolff et al, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser elaborado um anticorpo que contenha regiões Fc duplas e pode, desta forma, apresentar lise de complemento e capacidades de ADCC aprimoradas. Vide Stevenson et al, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

8. IMUNOCONJUGADOS:

A presente invenção também se refere a imunoconjugados que compreendem um anticorpo conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado).

Agentes quimioterapêuticos úteis na geração desses imunoconjugados incluem BCNU, estreptozoicina, vincristina, vinblastina, adriamicina e 5-fluorouracila.

Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos não de união de toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia rícina A, cadeia de abrina A, cadeia de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor momordica charantia, curcina, crotina, inibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos.

Conjugados do anticorpo e agente citotóxico são fabricados através da utilização de uma série de agentes de acoplamento de proteínas

PI0403964

bifuncionais, tais como 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidila (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCL), ésteres ativos (tais como suberato de dissucinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazonobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolieno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar uma imunotoxina rícina, por exemplo, conforme descrito em Vitetta et al, *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleto ao anticorpo. Vide o documento WO 94/11026. O ligante pode ser um "ligante divisível", que facilita a liberação da droga citotóxica na célula. Pode-se utilizar, por exemplo, ligante instável a ácidos, ligante sensível a peptidase, ligante de dimetila ou ligante que contém dissulfeto (Chari et al, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992)).

Além disso, as toxinas de moléculas pequenas, tais como caliqueamicina, maitansina (Patente US 5.208.020), tricoteno e CC1065 também são contempladas como toxinas conjugáveis para uso com a formulação de acordo com a presente invenção. Em uma realização, o anticorpo de comprimento total ou seus fragmentos de ligação de antígenos podem ser conjugados a uma ou mais moléculas de maitansinóide (tais como cerca de uma a cerca de dez moléculas de maitansinóide por molécula de anticorpo). Os maitansinóides são inibidores mitotóticos que agem através da inibição da polimerização de tubulina. Os maitansinóides, isolados de fontes naturais ou preparados sinteticamente, que incluem maitansina, maitansinal e seus derivados e análogos, foram descritos, por exemplo, na Patente US 5.208.020 e referências ali mencionadas (vide col. 2, linha 53 a col. 3, linha 10)

PI0403964

e Patentes US 3.896.111 e US 4.151.042. Métodos de preparação de conjugados de anticorpos e maitansinóides também são descritos na Patente US 5.208.020. Em realização preferida, um maitansinóide é ligado ao anticorpo através de um grupo de ligação de dissulfeto ou outro que contenha enxofre. Maitansina pode ser convertida, por exemplo, em May-SS-Me, que pode ser reduzido para May-SH3 e reagido com anticorpo modificado para gerar um imunoconjugado de maitansinóide e anticorpo. Chari et al, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992). O anticorpo pode ser modificado através de métodos conhecidos e o anticorpo que contém grupos tiol livres ou protegidos é reagido em seguida com um maitansinóide que contém dissulfeto para produzir o conjugado. A citotoxicidade do conjugado de anticorpo e maitansinóide pode ser medida *in vitro* ou *in vivo* através de métodos conhecidos e o IC_{50} é determinado.

Caliqueamicina é outro imunoconjugado de interesse. A família de caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir quebras de DNA de linhagem dupla em concentrações subpicomolares. Os análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas sem limitar-se a γ_1^1, α_2^1, α_3^1, N-acetil-γ_1^1, PSAG e θ^1_1 (Hinman et al, *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993) e Lode et al, *Cancer Res.* 58: 2925-2928 (1998)). Outras drogas antitumores às quais o anticorpo pode ser conjugado incluem QFA que é um antifolato. Tanto caliqueamicina quanto QFA contêm locais intracelulares de ações e não cruzam facilmente a membrana de plasma. Portanto, a absorção celular destes agentes através da internalização mediada por anticorpos aumenta grandemente os seus efeitos citotóxicos.

Os imunoconjugados formados entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, ribonuclease ou endonuclease de DNA, tal como desoxirribonuclease; DNase) também são contemplados.

PI0402964

O anticorpo pode também ser conjugado a um átomo altamente radioativo. Uma série de radionucletos é disponível para a produção de anticorpos rádio-conjugados. Exemplos incluem At^{211}, Bi^{212}, I^{131}, In^{131}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioativos de Lu. Quando for utilizado para diagnóstico, o conjugado pode compreender um átomo radioativo para estudos cintigráficos, tal como Tc^{99} ou I^{123}, ou uma marca de centrifugação para formação de imagem através de ressonância magnética nuclear (NMR) (também conhecida como formação de imagem por ressonância magnética, MRI), tal como iodo-123, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, nitrogênio-15, oxigênio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

As radiomarcas ou outras podem ser incorporadas ao conjugado de formas conhecidas. O peptídeo pode ser, por exemplo, biossintetizado ou pode ser sintetizado através de síntese química de aminoácidos, utilizando precursores de aminoácidos apropriados, envolvendo, por exemplo, flúor-19 no lugar de hidrogênio. Marcas tais como Tc^{99m}, I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} podem ser ligadas através de um resíduo de cisteína no peptídeo. Ítrio-90 pode ser ligado através de um resíduo de lisina. O método IODOGEN® pode ser utilizado para incorporar iodo-123, Fraker et al (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 (1978). Outros métodos de conjugação de radionucletos são descritos em *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy* (Chatal, CRC Press, 1989).

Alternativamente, pode ser fabricada uma proteína de fusão que compreende o anticorpo e o agente citotóxico, através, por exemplo, de técnicas recombinantes ou síntese de peptídeos. O comprimento de DNA pode compreender regiões correspondentes codificadoras das duas partes do conjugado, sejam eles adjacentes entre si ou separados por uma região codificadora de um peptídeo ligante que não destrua as propriedades desejadas do conjugado.

PI0403964

Em outra realização, o anticorpo pode ser conjugado a um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direcionamento de tumores, em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção de conjugado não ligado da circulação, utilizando um agente limpante e, em seguida, administração de um "ligante" (tal como avidina) que é conjugado a um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo).

9. IMUNOLIPOSSOMOS:

Os anticorpos descritos no presente podem também ser formulados como imunolipossomos. Um "lipossomo" é uma pequena vesícula composta de vários tipos de lipídios, fosfolipídios e/ou tensoativo que é útil para o fornecimento de drogas a mamíferos. Os componentes do lipossomo são comumente dispostos em formação bicamada, similar à disposição de lipídios de membranas biológicas.

Os lipossomos que contêm o anticorpo são preparados através de métodos conhecidos na técnica, conforme descrito em Epstein et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4030 (1980); e Patentes US 4.485.045 e US 4.544.545. Lipossomos com maior tempo de circulação são descritos na Patente US 5.013.556.

Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados através do método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídios que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomos são extrudados através de filtros com tamanho de poro definido para gerar lipossomos com o diâmetro desejado. Os fragmentos de Fab' do anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser conjugados aos lipossomos descritos em Martin et al, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) através de reação de intercâmbio de dissulfetos. Um agente quimioterapêutico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente contido no interior

PI0403864

do lipossomo. Vide Gabizon et al, *J. National Cancer Inst.* 81 (19): 1484 (1989).

10. OUTRAS MODIFICAÇÕES DE ANTICORPOS:

Outras modificações do anticorpo são contempladas no presente. O anticorpo pode ser ligado, por exemplo, a um dentre uma série de polímeros não proteináceos, tais como polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. O anticorpo pode também ser capturado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de aglutinação ou polimerização interfacial (tais como microcápsulas de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente) em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (tais como lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas e outras formulações apropriadas encontram-se descritas em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edição, Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

C. FORMULAÇÕES LIOFILIZADAS:

As formulações descritas no presente podem também ser preparadas como formulações liofilizadas reconstituídas. As proteínas ou os anticorpos descritos no presente são liofilizados e reconstituídos em seguida para produzir as formulações líquidas estáveis com viscosidade reduzida de acordo com a presente invenção. Nesta realização específica, após a preparação da proteína de interesse conforme descrito acima, é produzida uma "formulação pré-liofilizada". A quantidade de proteína presente na formulação pré-liofilizada é determinada tomando-se em conta os volumes de dose desejados, modo(s) de administração etc. A concentração inicial de um anticorpo intacto pode ser, por exemplo, de cerca de 2 mg/ml a cerca de 50 mg/ml, preferencialmente cerca de 5 mg/ml a cerca de 40 mg/ml e, de preferência superior, de cerca de 20 a 30 mg/ml.

PI0403964

1. Preparação de Formulações Liofilizadas:

A proteína a ser formulada encontra-se geralmente presente em solução. Nas formulações com viscosidade reduzida e resistência iônica elevada de acordo com a presente invenção, por exemplo, a proteína pode estar presente em solução tamponada com pH em pH de cerca de 4 a 8, preferencialmente cerca de 5 a 7. A concentração de tampão pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, alternativamente cerca de 3 mM a cerca de 15 mM, dependendo, por exemplo, do tampão e da tonicidade desejada da formulação (por exemplo, da formulação reconstituída). Exemplos de tampões e/ou sais são aqueles que são farmaceuticamente aceitáveis e podem ser criados a partir de seus ácidos, bases e sais apropriados, tais como aqueles que são definidos como ácidos, bases ou tampões "farmaceuticamente aceitáveis".

Em uma realização, adiciona-se um lioprotetor à formulação previamente liofilizada. A quantidade de lioprotetor na formulação previamente liofilizada geralmente é tal que, mediante reconstituição, a formulação resultante será isotônica. Entretanto, formulações reconstituídas hipertônicas podem também ser apropriadas. Além disso, a quantidade de lioprotetor não deve ser tão baixa a ponto que ocorra quantidade inaceitável de degradação/agregação da proteína durante a liofilização. Entretanto, exemplos de concentrações de lioprotetor na formulação previamente liofilizada são de cerca de 10 mM a cerca de 400 mM, alternativamente cerca de 30 mM a cerca de 300 mM, alternativamente cerca de 50 mM a cerca de 100 mM. Exemplos de lioprotetores incluem açúcares e álcoois de açúcar, tais como sacarose, manose, trehalose, glicose, sorbitol e manitol. Entretanto, sob circunstâncias específicas, certos lioprotetores podem também contribuir para aumentar a viscosidade da formulação. Desta forma, dever-se-á tomar cuidado para selecionar lioprotetores específicos que minimizam ou neutralizam este efeito.

PI0403964

Lioprotetores adicionais são descritos acima sob a definição de "lioprotetores", também denominados no presente "açúcares" farmaceuticamente aceitáveis".

A razão entre proteína e lioprotetor pode variar para cada combinação de lioprotetor e proteína ou anticorpo específica. No caso de um anticorpo como proteína selecionada e açúcar (tal como sacarose ou trehalose) como lioprotetor para gerar formulação reconstituída isotônica com alta concentração de proteína, a razão molar entre lioprotetor e anticorpo pode ser de cerca de 100 a cerca de 1500 moles de lioprotetor para um mol de anticorpo, preferencialmente cerca de 200 a cerca de 1000 moles de lioprotetor para um mol de anticorpo, tal como cerca de 200 a cerca de 600 moles de lioprotetor para um mol de anticorpo.

Em realização preferida, pode ser desejável adicionar um tensoativo à formulação previamente liofilizada. Alternativa ou adicionalmente, o tensoativo pode ser adicionado à formulação liofilizada e/ou à formulação reconstituída. Exemplos de tensoativos incluem tensoativos não iônicos, tais como polissorbatos (por exemplo, polissorbatos 20 ou 80); polioxâmeros (tais como poloxâmero 188); Triton; sódio octil glicosídeo; lauril, miristil, linoleil ou estearil-sulfobetaína; lauril, miristil, linoleil ou estearil-sarcosina; linoleil, miristil ou cetil-betaína; lauroamidopropil, cocamidopropil, linoleamidopropil, miristamidopropil, palmidopropil ou isoestearamidopropil-betaína (tal como lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil ou isoestearamidopropil-dimetilamina; sódio metil cocoil ou dissódio metil oleil-taurato; e a série MONAQUA® (Mona Industries, Inc., Paterson, Nova Jérsei, Estados Unidos), polietil glicol, polipropil glicol e copolímeros de etileno e propileno glicol (tais como Pluronics, PF68 etc.). A quantidade de tensoativo adicionada é tal que reduz a formação de partículas da proteína reconstituída e minimiza a formação de particulados após a reconstituição. O tensoativo pode estar presente, por exemplo, na formulação previamente liofilizada em quantidade de

PI0403964

cerca de 0,001 a 0,5%, alternativamente cerca de 0,005 a 0,05%.

Uma mistura do lioprotetor (tal como sacarose ou trehalose) e agente formador de volume (tal como manitol ou glicina) pode ser utilizada na preparação da formulação pré-liofilização. O agente formador de volume pode permitir a produção de um aglomerado liofilizado uniforme sem bolsos excessivos no seu interior etc. Outros veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis, tais como os descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980), podem ser incluídos na formulação previamente liofilizada (e/ou a formulação liofilizada e/ou a formulação reconstituída), desde que não prejudiquem as características desejadas da formulação. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os pacientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem: agentes tamponadores adicionais; conservantes; co-solventes; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; agentes quelantes, tais como EDTA; complexos metálicos (tais como complexos de Zn e proteína); polímeros biodegradáveis, tais como poliésteres; e/ou contraíons formadores de sais, tais como sódio.

A formulação do presente pode também conter mais de uma proteína, conforme o necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente aquelas com atividades complementares que não prejudiquem a outra proteína. Pode ser desejável, por exemplo, fornecer dois ou mais anticorpos que se liguem ao alvo desejado (tal como receptor ou antígeno) em uma única formulação. Estas proteínas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito desejado.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido por filtragem através de membranas de filtragem estéreis, antes ou depois da liofilização e

PI0403964

reconstituição. Alternativamente, a esterilidade de toda a mistura pode ser obtida através de autoclave dos ingredientes, exceto pela proteína, a cerca de 120 °C por cerca de trinta minutos, por exemplo.

Após a mistura da proteína, lioprotetor opcional e outros componentes opcionais entre si, a formulação é liofilizada. Muitos secadores de congelamento diferentes são disponíveis para este propósito, tais como secadores por congelamento Hull50® (Hull, Estados Unidos) ou GT20® (Leybold-Heraeus, Alemanha). A secagem por congelamento é obtida através do congelamento da formulação e subseqüente sublimação de gelo do conteúdo congelado sob temperatura apropriada para secagem primária. Sob esta condição, a temperatura do produto está abaixo do ponto eutético da temperatura de colapso da formulação. Tipicamente, a temperatura de prateleira para a secagem primária variará de cerca de -30 a 25 °C (desde que o produto permaneça congelado durante a secagem primária) sob pressão apropriada, que varia tipicamente de cerca de 50 a 250 mTorr. A formulação, tamanho e tipo do recipiente que retém a amostra (tal como ampola de vidro) e o volume de líquido ditarão principalmente o tempo necessário para secagem, que pode variar de algumas horas até vários dias (por exemplo, 40 a 60 horas). Opcionalmente, pode também ser realizado um estágio de secagem secundário, dependendo do nível de umidade residual desejado no produto. A temperatura à qual é conduzida a secagem secundária varia de cerca de 0 a 40 °C, dependendo principalmente do tipo e do tamanho do recipiente e do tipo de proteína empregado. A temperatura em armazenagem ao longo de toda a fase de remoção de água de liofilização pode ser, por exemplo, de cerca de 15 a 30 °C (por exemplo, cerca de 20 °C). O tempo e a pressão necesários para secagem secundária serão tais que produzam um aglomerado liofilizado apropriado, dependendo, por exemplo, da temperatura e de outros parâmetros. O tempo de secagem secundário é ditado pelo nível de umidade residual

PI0403964

desejado no produto e tipicamente leva pelo menos cerca de cinco horas (tal como de dez a quinze horas). A pressão pode ser a mesma empregada durante a etapa de secagem primária. As condições de secagem por congelamento podem variar, dependendo da formulação e do tamanho da ampola.

2. RECONSTITUIÇÃO DE FORMULAÇÃO LIOFILIZADA:

Antes da administração ao paciente, a formulação liofilizada é reconstituída com diluente farmaceuticamente aceitável, de tal forma que a concentração de proteína na formulação reconstituída seja de pelo menos cerca de 50 mg/ml, tal como cerca de 50 mg/ml a cerca de 400 mg/ml, alternativamente cerca de 80 mg/ml a cerca de 300 mg/ml, alternativamente cerca de 90 mg/ml a cerca de 150 mg/ml. Essas altas concentrações de proteína na formulação reconstituída são consideradas particularmente úteis quando se pretender fornecimento subcutâneo da formulação reconstituída. Entretanto, para outras vias de administração, tais como administração intravenosa, podem ser desejadas concentrações mais baixas da proteína na formulação reconstituída (por exemplo, cerca de 5 a 50 mg/ml ou cerca de 10 a 40 mg/ml de proteína na formulação reconstituída). Em certas realizações, a concentração de proteína na formulação reconstituída é significativamente mais alta que na formulação previamente liofilizada. A concentração de proteína na formulação reconstituída pode ser, por exemplo, de cerca de duas a quarenta vezes, alternativamente de três a dez vezes, alternativamente de três a seis vezes (por exemplo, pelo menos três vezes ou pelo menos quatro vezes) a da formulação previamente liofilizada.

A reconstituição geralmente tem lugar sob temperatura de cerca de 25 °C para garantir hidratação completa, embora outras temperaturas possam ser empregadas conforme o desejado. O tempo necessário para reconstituição dependerá, por exemplo, do tipo de diluente, quantidade de

PI0403964

excipiente(s) e proteína. Exemplos de diluentes incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (BWFI), solução tamponada com pH (tal como solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose. O diluente contém opcionalmente um conservante. Exemplos de conservantes foram descritos acima, com álcoois aromáticos tais como álcool benzílico ou fenólico sendo os conservantes preferidos. A quantidade de conservante empregada é determinada através da avaliação de diferentes concentrações de conservantes para compatibilidade com o teste de eficácia do conservante e proteína. Caso o conservante seja um álcool aromático, por exemplo (tal como álcool benzílico), ele pode estar presente em quantidade de cerca de 0,1 a 2,0% e, preferencialmente, cerca de 0,5 a 1,5%, mas de preferência superior cerca de 1,0 a 1,2%.

Preferencialmente, a formulação reconstituída contém menos de 6000 partículas por ampola, que possuem tamanho de ≥ 10 μm.

D. FORMULAÇÕES LÍQUIDAS:

São preparadas formulações terapêuticas para armazenagem através de mistura do ingrediente ativo que possui o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edição, Mack Publishing Co., Easton PA 18042, Estados Unidos (1990)). Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os pacientes às dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões, antioxidantes que incluem ácido ascórbico, metionina, vitamina E e metabissulfito de sódio; conservantes, isotonificantes, estabilizantes, complexos metálicos (tais como complexos de proteína e Zn); agentes quelantes tais como EDTA e/ou tensoativos não iônicos.

Quando o agente terapêutico for um fragmento de anticorpo, é preferido o menor fragmento inibidor que se liga especificamente ao domínio de

PI0403964

ligação da proteína alvo. Com base nas seqüências de região variável de um anticorpo, por exemplo, podem ser projetados fragmentos de anticorpos ou até moléculas de peptídeos que retêm a capacidade de ligar a seqüência de proteína alvo. Esses peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos através de tecnologia de DNA recombinante (vide, por exemplo, Marasco et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 7889-7893 (1993)).

São utilizados tampões para controlar o pH em faixa que otimiza a eficácia terapêutica, especialmente se a estabilidade for dependente do pH. Tampões encontram-se preferencialmente presentes em concentrações que variam de cerca de 50 mM a cerca de 250 mM. Agentes tamponadores apropriados para uso com a presente invenção incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e seus sais. Por exemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato e acetato. Além disso, os tampões podem ser compostos de sais de histidina e trimetilamina, tais como Tris.

São adicionados conservantes para retardar o crescimento microbiano e eles estão tipicamente presentes em faixa de 0,2% a 1,0% (p/v). Conservantes apropriados para uso com a presente invenção incluem (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio); cloreto de hexametônio; haletos de benzalcônio (tais como cloreto, brometo e iodeto), cloreto de benzetônio; álcool timerosálico, fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabens, tais como metil ou propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol e *m*-cresol.

Agentes de tonicidade, às vezes conhecidos como "estabilizantes", estão presentes para ajustar ou manter a tonicidade de composições líquidas. Quando utilizados com biomoléculas grandes e carregadas, tais como proteínas e anticorpos, eles são freqüentemente denominados "estabilizadores", pois podem interagir com os grupos carregados das cadeias laterais de aminoácidos, de forma a reduzir o potencial de

PI0403964

interações inter e intramoleculares. Agentes de tonicidade podem estar presentes em qualquer quantidade de 0,1% a 25% em peso, preferencialmente de 1 a 5%, considerando as quantidades relativas dos demais ingredientes. Os agentes de tonicidade incluem álcoois de açúcar póli-hídricos, preferencialmente álcoois de açúcar tri-hídricos ou superiores, tais como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol.

Excipientes adicionais incluem agentes que podem servir como um ou mais dos seguintes: (1) agentes formadores de volume, (2) amplificadores da solubilidade, (3) estabilizantes e (4) agentes que evitam a desnaturação ou aderência à parede do recipiente. Os estabilizantes podem estar presentes na faixa de 0,1 a 10.000 partes em peso de anticorpo ou proteína ativa. Os estabilizantes típicos incluem: álcoois de açúcar póli-hídrico (enumerados acima); aminoácidos, tais como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina etc.; açúcares orgânicos ou álcoois de açúcar, tais como sacarose, lactose, lactitol, trehalose, estaquiose, manose, sorbose, xilose, ribose, ribitol, mioinisitose, mioinisitol, galactose, galactitol, glicerol, ciclitóis (tais como inositol), polietileno glicol; agentes redutores que contêm enxofre, tais como uréia, glutationa, ácido tióctico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, α-monotioglicerol e tiossulfato de sódio; proteínas de baixo peso molecular, tais como albumina de soro humano, albumina de soro bovino, gelatina ou outras imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; monossacarídeos (tais como xilose, manose, frutose, glicose); dissacarídeos (tais como lactose, maltose, sacarose); trissacarídeos tais como rafinose; e polissacarídeos, tais como dextrina ou dextran.

Tensoativos não iônicos ou detergentes (também conhecidos como "agentes umectantes") estão presentes para ajudar a solubilizar o agente terapêutico, bem como proteger a proteína terapêutica contra a agregação

PI0403964

induzida por agitação, o que também permite que a formulação seja exposta a tensão superficial de corte sem causar desnaturação da proteína ou anticorpo terapêutico ativo. Os tensoativos não iônicos estão presentes em faixa de cerca de 0,05 mg/ml a cerca de 1,0 mg/ml, preferencialmente cerca de 0,07 mg/ml a cerca de 0,2 mg/ml.

Os tensoativos não iônicos apropriados incluem polissorbatos (20, 40, 60, 65, 80 etc.), polioxâmeros (184, 188 etc.), polióis Pluronic®, Triton®, monoéteres de polioxietileno sorbitan (Tween® 20, Tween® 80 etc.), lauromacrogol 400, estearato de polioxila 40, óleo de mamona hidrogenado com polioxietileno 10, 50 e 60, monoestearato de glicerol, éster de ácido graxo de sacarose, metil celulose e carboximetil celulose. Os detergentes aniônicos que podem ser utilizados incluem lauril sulfato de sódio, sulfossuccinato de dioctil sódio e sulfonato de dioctil sódio. Detergentes catiônicos incluem cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio.

Para que as formulações sejam utilizadas para administração *in vivo*, elas devem ser estéreis. A formulação pode ser tornada estéril por filtragem através de membranas de filtragem estéreis. As composições terapêuticas do presente são geralmente colocadas em um recipiente que contém uma porta de acesso estéril, tal como saco ou ampola de solução intravenosa que contém uma tampa perfurável através de agulha de injeção hipodérmica.

A via de administração é de acordo com métodos conhecidos e aceitos, tais como injeção ou infusão de uma ou mais misturas por longo período de tempo de maneira apropriada, tal como injeção ou infusão através de vias subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional ou intraarticular, administração tópica, inalação ou através de meios de liberação prolongada ou estendida.

A formulação do presente pode também conter mais de um

PI0403964

composto ativo, conforme o necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente os que tenham atividades complementares que não se prejudiquem entre si. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente citotóxico, citoquina ou agente inibidor do crescimento. Essas moléculas estão apropriadamente presentes em combinação, em quantidades que são eficazes para o propósito desejado.

Os ingredientes ativos também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de acumulação ou polimerização interfacial, tais como microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de póli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Essas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edição, acima.

Podem ser fabricadas preparações de liberação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o anticorpo, com essas matrizes estando na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como metacrilato de (póli)2-hidroxietila ou álcool (póli)vinílico), polilactídeos (Patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ-etila, etileno-vinil acetato não degradável, copolímeros de ácido glicólico e ácido láctico degradáveis, tais como DEPOT® da LUPRON (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido póli-D-(-)-3-hidroxibutírico. A microencapsulação de proteínas recombinantes para liberação prolongada foi realizada com sucesso com hormônio do crescimento humano (rhGH), interferona (rhIFN-), interleucina-2 e MN rpg 120. Johnson et al, *Nat. Med.* 2:

PI0403964

795-799 (1996); Yasuda et al, *Biomed. Ther.* 27: 1221-1223 (1993); Hora et al, *Bio/Technology* 8: 755-758 (1990); Cleland, *Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems* em *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell e Newman, eds. (Plenum Press: Nova Iorque, Estados Unidos, 1995), págs. 439-462; documentos WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; e Patente US 5.654.010.

As formulações de liberação prolongada destas proteínas podem ser desenvolvidas utilizando polímero de ácido pólilláctico-coglicólico (PLGA) devido à sua biocompatibilidade e ampla faixa de propriedades biodegradáveis. Os produtos de degradação de PLGA, ácidos láctico e glicólico, podem ser limpos rapidamente no corpo humano. Além disso, a capacidade de degradação deste polímero pode ser ajustada em meses até anos, dependendo do seu peso molecular e composição. Lewis, *Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymer* em *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker, Nova Iorque, Estados Unidos, 1990), M. Chasin e R. Langer (eds.), págs. 1-41.

Embora polímeros tais como etileno-vinil acetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de cem dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo por longo período, eles podem desnaturar-se ou agregar-se, como resultado da exposição à umidade a 37 °C, o que resulta em perda da atividade biológica e possíveis mudanças da imunogenicidade. Podem ser idealizadas estratégias racionais para estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Caso se descubra, por exemplo, que o mecanismo de agregação é a formação de ligação S-S intermolecular através de troca de tiodissulfeto, pode-se atingir a estabilização através da modificação de resíduos sulfidrila, liofilização a partir de soluções

PI0403964

ácidas, controle do teor de umidade, uso de aditivos apropriados e desenvolvimento de composições de matriz de polímero específicas.

Composições de proteinóides ou lipossômicas podem também ser utilizadas para formular as proteínas ou os anticorpos descritos no presente. Vide as Patentes US 4.925.673 e US 5.013.556.

A estabilidade das proteínas e dos anticorpos descritos no presente pode ser aumentada através do uso de "sais metálicos polivalentes hidrossolúveis" não tóxicos. Exemplos incluem Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Al^{2+} e Al^{3+}. Exemplos de ânions que podem formar sais hidrossolúveis com os cátions metálicos polivalentes acima incluem os formados a partir de ácidos inorgânicos e/ou ácidos orgânicos. Esses sais hidrossolúveis possuem solubilidade em água (a 20 °C) de pelo menos cerca de 20 mg/ml, alternativamente pelo menos cerca de 100 mg/ml, alternativamente pelo menos cerca de 200 mg/ml.

Os ácidos inorgânicos apropriados que podem ser utilizados para formar os "sais metálicos polivalentes hidrossolúveis" incluem ácido cloridrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiociânico e fosfórico. Os ácidos orgânicos apropriados que podem ser utilizados incluem ácido carboxílico alifático e ácidos aromáticos. Os ácidos alifáticos, dentro da presente definição, podem ser definidos como ácidos C_{2-9} carboxílicos saturados ou instaurados (tais como ácidos mono, di e tricarboxílicos alifáticos). Exemplos de ácidos monocarboxílicos dentro da presente definição incluem, por exemplo, os ácidos C_{2-9} monocarboxílicos saturados acético, propiônico, butírico, valérico, capróico, enântico, caprílico, pelargônico e capriônico e os ácidos C_{2-9} monocarboxílicos insaturados acríclico, propiólico, metacrílico, crotônico e isocrotônico. Exemplos de ácidos dicarboxílicos incluem os ácidos C_{2-9} dicarboxílicos saturados malônico, succínico, glutárico, adípico e pimélico, enquanto os ácidos C_{2-9} dicarboxílicos insaturados incluem ácidos maleico,

PI0403964

fumárico, citracônico e mesacônico. Exemplos de ácidos tricarboxílicos incluem os ácidos C_{2-9} tricarboxílicos saturados ácido tricarbalílico e 1,2,3-butanotricarboxílico. Além disso, os ácidos carboxílicos de acordo com a presente definição podem também conter um ou dois grupos hidroxila para formar ácidos hidróxi carboxílicos. Exemplos de ácidos hidróxi carboxílicos incluem ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrônico, málico, tartárico e cítrico. Os ácidos aromáticos dentro da presente definição incluem ácido benzóico e salicílico.

Sais de metais polivalentes hidrossolúveis comumente empregados que podem ser utilizados para ajudar a estabilizar os polipeptídeos encapsulados de acordo com a presente invenção incluem, por exemplo: (1) os sais metálicos de ácidos inorgânicos de haletos (tais como cloreto de zinco e cloreto de cálcio), sulfatos, nitratos, fosfatos e tiocianatos; (2) os sais metálicos de ácido carboxílico alifático (tais como acetato de cálcio, acetato de zinco, propionato de cálcio, glicolato de zinco, lactato de cálcio, lactato de zinco e tartrato de zinco); e (3) os sais metálicos de ácido carboxílico aromático de benzoatos (tais como benzoato de zinco) e salicilatos.

E. MÉTODOS DE TRATAMENTO:

Para a prevenção ou o tratamento da doença, a dosagem apropriada de um agente ativo dependerá do tipo de doença a ser tratada, conforme definido acima, da severidade e do curso da doença, se o agente é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do paciente e reação ao agente e o critério do médico atendente. O agente é administrado apropriadamente ao paciente de uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos.

Um método de tratamento preferido é o tratamento de disfunções mediadas por IgE. As disfunções mediadas por IgE incluem disfunções atópicas, que são caracterizadas por propensão herdada de reação

PI0403964

imunológica a muitos antígenos ingeridos e inalados de ocorrência natural comuns e à produção contínua de anticorpos de IgE. Disfunções atópicas específicas incluem asma, rinite alérgica, dermatite atópica e gastroenteropatia alérgica. Pacientes atópicos freqüentemente possuem diversas alergias, o que indica que eles possuem anticorpos IgE para muitos alérgenos ambientais e sintomas deles, incluindo pólens, fungos (tais como mofos), partículas de animais e insetos e certos alimentos.

Entretanto, as disfunções associadas a níveis elevados de IgE não se limitam à etiologia herdada (atópica). Outras disfunções associadas a níveis de IgE elevados que aparentemente são mediadas por IgE e podem ser tratadas com as formulações de acordo com a presente invenção incluem hipersensibilidade (tal como hipersensibilidade anafilática), eczema, urticária, aspergilose broncopulmonar alérgica, doenças parasíticas, síndrome de hiper IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma de IgE e reação de enxerto contra hospedeiro.

Rinite alérgica, também conhecida como rinoconjuntivite alérgica ou febre do feno, é a manifestação mais comum de reação atópica a alérgenos inalados, cuja severidade e duração é freqüentemente correlacionada à intensidade e duração da exposição ao alérgeno. Trata-se de doença crônica, que pode aparecer em primeiro lugar em qualquer idade, mas cuja instalação ocorre normalmente durante a infância ou adolescência. Ataque típico consiste de rinorréia aquosa em profusão, espirros paroxismais, obstrução nasal e coceira no nariz e palato. Drenagem do muco pós-nasal também causa dor de garganta, pigarro e tosse. Pode também haver sintomas de blefaroconjuntivite alérgica, com intensa coceira da conjuntiva e pálpebras, vermelhidão, lacrimejação e fotofobia. Ataques severos são freqüentemente acompanhados por dor de cabeça sistêmica, fraqueza, fadiga e, às vezes, dores musculares após períodos intensos de espirros.

PI0403964

Asma, também conhecida como doença obstrutiva das vias aéreas reversível, é caracterizada por hiper-reação da árvore traqueobrônquica a irritantes respiratórios e substâncias bronquiorrestritoras, produzindo ataques de espirros, dispnéia, dureza no peito e tosse que são reversíveis espontaneamente ou com tratamento. É doença crônica que envolve todas as vias aéreas, mas sua severidade varia de episódios temporários suaves ocasionais até obstrução brônquica crônica e severa que ameaça a vida. Asma e atopia podem coexistir, mas somente cerca da metade dos asmáticos também é atópica e percentual ainda menor de pacientes atópicos também possui asma. Atopia e asma, entretanto, não são completamente independentes, pois a asma ocorre mais freqüentemente entre indivíduos atópicos que entre não atópicos, especialmente durante a infância. A asma foi historicamente dividida em dois subgrupos, asma extrínseca e asma intrínseca.

A asma extrínseca, também conhecida como asma alérgica, atópica ou imunológica, descreve pacientes que geralmente desenvolvem asma cedo na vida, normalmente durante a infância. Outras manifestações de atopia, que incluem eczema ou rinite alérgica, freqüentemente coexistem. Ataques asmáticos podem ocorrer durante sessões de pólen, na presença de animais ou mediante exposição a poeira doméstica, travesseiros de penas ou outros alérgenos. Testes dérmicos exibem reações positivas de pústula e chama aos alérgenos causadores. De forma interessante, as concentrações totais de IgE no soro são freqüentemente elevadas, mas às vezes são normais.

A asma intrínseca, também conhecida como asma não alérgica ou idopática, ocorre tipicamente em primeiro lugar durante a vida adulta, após infecção respiratória aparente. Os sintomas incluem obstrução brônquica crônica ou recorrente não relacionada com sessões de pólen ou exposição a outros alérgenos. Os testes dérmicos são negativos para os alérgenos atópicos habituais e a concentração de IgE no soro é normal. Sintomas adicionais

PI0403964

incluem sangue na saliva e eosinofilia. Outros esquemas de classificação de asma em subgrupos, tais como sensível a aspirina, induzida por exercício, infecciosa e psicológica meramente definem fatores acionadores externos que afetam certos pacientes mais que a outros.

Por fim, é importante observar que, embora algumas classificações tenham historicamente associado asma alérgica somente à dependência de IgE, existem agora fortes dados estatisticamente significativos que exibem correlação entre IgE e asma (tanto alérgica quanto não alérgica). Capítulo 27, *The Atopic Diseases*, A. I. Terr em *Medical Immunology*, nona edição, Simon e Schuster, Stites et al, Ed. (1997). Como resultado, a expressão "disfunções mediadas por IgE", para os propósitos do presente pedido de patente, incluem asma alérgica e não alérgica.

Os sinais físicos de ataque de asma incluem taquipnéia, espirros audíveis e o uso de músculos acessórios de respiração. Pulso rápido e pressão arterial elevada também estão tipicamente presentes, bem como níveis elevados de eosinófilos nas secreções nasais e sangue periférico. As funções pulmonares exibem redução das velocidades de fluxo e volume expiratório forçado de um segundo (FEV_1). A capacidade total do pulmão e a capacidade residual funcional são tipicamente normais ou levemente aumentadas, mas podem ser reduzidas com bronquioespasmos extremos.

A patologia da asma pode ser diferenciada por reações de fase precoce e fase posterior. A face precoce é caracterizada por contração dos músculos moles, edema e hipersecreção, enquanto as reações de fase posterior por inflamações celulares. A asma pode ser induzida por vários acionadores não específicos, que incluem infecções (tais como infecções respiratórias virais), fatores fisiológicos (tais como exercício, hiperventilação, respiração profunda, fatores psicológicos), fatores atmosféricos (tais como dióxido de enxofre, amônia, ar frio, ozônio, vapor d'água destilado), ingestores

PI0403964

(tais como propranolol, aspirina, drogas antiinflamatórias não esteroidais), inaladores experimentais (tais como soluções hipertônicas, ácido cítrico, histamina, metacolina, prostaglandina $F_{2\alpha}$) e inaladores ocupacionais (tais como isocianatos). Vários alérgenos ambientais ou ocupacionais adicionais que causam asma alérgica podem incluir produtos animais, pós para insetos, criaturas do mar, produtos vegetais, frutas, sementes, folhas e pólens, tinturas orgânicas e tintas, agentes microbianos, enzimas, agentes terapêuticos, agentes esterilizantes, substâncias orgânicas e inorgânicas.

Dermatite atópica, também conhecida como eczema, neurodermatite, eczema atópico ou prurido de Besnier, é disfunção dérmica crônica comum específica para um subconjunto de pacientes com as características familiares e imunológicas de atopia. A característica essencial é reação inflamatória dérmica prurítica, que induz erupção dérmica distribuída simetricamente característica com predileção por certos locais. Existe também freqüente sobreprodução de IgE por linfócitos B. Embora a dermatite atópica seja classificada como forma cutânea de atopia por ser associada a rinite alérgica, asma e altos níveis de IgE, a severidade da dermatite, entretanto, nem sempre é relacionada à exposição a alérgenos durante teste na pele e a dessensibilização (ao contrário de outras doenças alérgicas) não é tratamento eficaz. Embora alto IgE em soro confirme o diagnóstico de asma alérgica, níveis normais não o inibem. A instalação da doença pode ocorrer em qualquer idade e as lesões agudas começam com papula edematosa eritematose ou placa com escamação. A coceira gera lacrimejação e formação de crosta, depois a liquenificação crônica. Em nível celular, a lesão aguda é edemosa e a derme é infiltrada com células mononucleares, linfócitos CD4. Neutrófilos, eosinófilos, células de plasma e basófilos são raros, mas células mastro desgranuladas estão presentes. Lesões crônicas apresentam hiperplasia epidérmica, hiperceratose e paraceratose e a derme é infiltrada com células

PI0403964

mononucleares, células de Langerhans e células mastro. Pode também haver áreas focais de fibrose, que incluem o envolvimento do perineu de nervos pequenos.

Gastroenteropatia alérgica, também conhecida como gastroenteropatia eosinofílica, é manifestação atópica incomum na qual as sensibilidades alimentares a vários IgE são associadas a reação da mucosa do trato gastrointestinal local. É rara em adultos, mas mais comum, mas temporária, em crianças. A condição resulta quando alérgenos alimentares ingeridos reagem com anticorpos IgE locais na mucosa em jejum e liberam mediadores de células mastro, resultando em sintomas gastrointestinais pouco após a refeição. Exposição contínua produziu inflamações crônicas, resultando em perda de proteínas gastrointestinais e edema hipoproteinêmico. A perda de sangue através da mucosa intestinal inflamada pode ser suficientemente significativa para causar anemia com deficiência de ferro. A reação alérgica ocorre localmente na mucosa gastrointestinal superior após a exposição a alérgenos, mas é resolvida evitando-se alérgenos.

Anafilaxia e urticária são claramente mediadas por IgE, mas não contêm determinantes genéticos e não possuem predileção por indivíduos atópicos. Anafilaxia é uma reação alérgica aguda e generalizada com envolvimento simultâneo de vários sistemas de órgãos, normalmente cardiovasculares, respiratórios, cutâneos e gastrointestinais. A reação é mediada imunologicamente e ocorre durante a exposição a alérgenos aos quais o paciente tenha sido sensibilizado anteriormente. Urticária e angioedema designam inchaço físico, eritema e coceira resultantes de receptor estimulado por histamina em vasos sangüíneos cutâneos superficiais e são a característica cutânea marcante da anafilaxia sistêmica. Anafilaxia sistêmica é a ocorrência de reação mediada por IgE simultaneamente em vários órgãos, resultante de drogas, veneno de insetos ou alimentos. É causada subitamente

PI0403964

por IgE carregado com células mastro induzido por alérgenos, resultando em profunda alteração ameaçadora da vida no funcionamento de vários órgãos vitais. O colapso vascular, obstrução aguda das vias aéreas, edema e vasodilatação cutânea e espasmos musculares gastrointestinais e genitourinários ocorrem quase simultaneamente, embora nem sempre ao mesmo grau.

A patologia da anafilaxia inclui angioedema e pulmões hiperinflados, com obstrução da mucosa das vias aéreas e ateletase focal. Em nível celular, os pulmões aparecem de forma similar a durante ataque agudo de asma, com hipersecreção das glândulas submucosas brônquicas, edema da mucosa ou submucosa, congestão vascular peribrônquica e eosinofilia nas paredes brônquicas. Edema e hemorragia pulmonar podem estar presentes. Espasmos dos músculos brônquicos, hiperinflação e até ruptura de alvéolos podem também estar presentes. Características importantes da anafilaxia humana incluem edema, congestão vascular e eosinofilia na lâmina própria da laringe, traquéia, epiglote e hipofaringe.

A exposição ao alérgeno pode ocorrer através de ingestão, injeção, inalação ou contato com a pele ou membrana mucosa. A reação inicia-se em segundos ou minutos após a exposição ao alérgeno. Pode existir surpresa inicial ou sensação de condenação por impedimento, seguida rapidamente por sintomas em um ou mais sistemas de órgãos alvo: cardiovascular, respiratório, cutâneo e gastrointestinal.

Os alérgenos responsáveis pela anafilaxia diferem dos comumente associados a atopia. Alimentos, drogas, venenos de insetos ou látex são as fontes comuns. Os alérgenos alimentícios incluem os encontrados em crustáceos, moluscos (tais como lagosta, camarão, caranguejo), peixes, legumes (tais como amendoins, ervilhas, feijão, alcaçuz), sementes (tais como gergelim, semente de algodão, alcaravia, mostarda, linhaça, girassol), nozes,

PI0403964

bagas, claras de ovos, trigo sarraceno e leite. Alérgenos de drogas incluem os encontrados em polipeptídeos e proteínas heterólogas, polissacarídeos e drogas haptênicas. Alérgenos de insetos incluem insetos heminópteros, que incluem as abelhas, vespa amarela, vespão, vespa e formiga do fogo.

Embora epinefrina seja o tratamento típico para anafilaxia, anti-histamina ou outros bloqueadores de histamina são tipicamente receitados para reação angioedêmica ou urticária menos severa.

F. TERAPIAS DE COMBINAÇÃO:

O método de acordo com a presente invenção pode ser combinado com métodos de tratamento conhecidos para disfunções mediadas por IgE, seja na forma de etapas de tratamento adicionais ou combinadas ou como componentes adicionais de formulações terapêuticas.

Anti-histaminas, por exemplo, especialmente anti-histaminas não sedativas, podem ser administradas, antes, depois ou simultaneamente com os anticorpos anti-IgE de acordo com a presente invenção. Anti-histaminas apropriadas incluem as da alquilamina (tais como clorfeniramina), etanolamina (tais como difenidramina) e fenotiazina (tais como prometazina). Embora várias anti-histaminas antagonizem os efeitos farmacológicos de histamina através de bloqueio dos seus locais receptores sobre as células efetoras, outras drogas anti-histamínicas comuns operam através do bloqueio da liberação de histamina de células mastro que tenham sido sensibilizadas e armadas com IgE específico de alérgenos (tal como cromolin sódio). Exemplos de anti-histaminas incluem astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, cloridrato de cetirizina, fumarato de clemastina, cloridrato de ciproheptadina, maleato de dexbronfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenidrinato, cloridrato de difenidramina, succinato de doxilamina, cloridrato de fexofendadina, cloridrato de terfenadina, cloridrato de hidroxizina, loratidina, cloridrato de meclizina, citrato de tripelanamina,

PI0403984

cloridrato de tripelenamina e cloridrato de triprolidina.

Sintomas específicos de disfunções mediadas por IgE (tais como reações de fase precoce) podem ser melhorados com simpatomiméticos ou drogas que possuem efeito bronquiodilatador. Epinefrina é um alfa e beta-adrenérgico de ação ampla freqüentemente administrado por via subcutânea em dose de 0,2 a 0,5 ml de solução aquosa 1:100. Forma de ação mais longa de epinefrina (ou seja, terbutalina) em suspensão 1:200 também é utilizada quando se deseja efeito de duração mais longa. Beta-adrenérgicos adicionais apropriados incluem abuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, isoetarina e formoterol para administração por via nasal (tal como nebulizador manual, dispositivo de respiração sob pressão positiva intermitente ou inaldores pressurizados por dose medida) ou oral.

A bronquiodilatação pode também ser atingida através da administração de xantinas, especialmente quando são administradas em combinação com as drogas simpatomiméticas acima. Exemplos de xantinas incluem aminofilina (iv. 250 a 500 mg) e teofilina (oral, 10 a 20 μg/ml de concentração em soro).

Outros sintomas de várias disfunções mediadas por IgE (tais como reações de fase posterior) podem ser atenuados através de tratamento com glucocorticóides ou outras drogas que possuem efeitos antiinflamatórios. Prednisona (30 a 60 mg por dia) é administrada sistemicamente para ataques severos, enquanto dipropionato de beclometasona, triancinolono acetonida e flunisolida são administradas em forma de aerossol como terapia de manutenção a longo prazo. Além disso, coricoesteróides que possuem efeitos antiinflamatórios incluem: betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona e triancinolona.

Drogas antiinflamatórias não esteroidais que podem também ser

PI0403964

utilizadas em combinação com os métodos terapêuticos de acordo com a presente invenção incluem acetaminofen, aspirina, bromfenac sódio, diclofenac sódio, diflunisal, etodolac, fenoprofen cálcio, flurbiprofen, ibuprofen, indometacina, cetoprofen, meclofenamato sódio, ácido mefenâmico, nabumetona, naproxen, naproxen sódio, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac e tolmetin sódio.

Além disso, pode também ser atingido benefício terapêutico máximo com a administração de descongestionantes (tais como fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefadrin), supressores da tosse (tais como dextrometorfan, codeína ou hidrocodona) ou analgésicos (tais como acetaminofen e aspirina).

A dessensibilização de alérgenos é forma de tratamento na qual os alérgenos são injetados no paciente com o propósito de redução ou eliminação da reação alérgica. Também é conhecida como imunoterapia de alérgenos, hipossensibilização ou terapia de injeção de alergia. É freqüentemente utilizada em combinação com outros tratamentos de alergia, mas não freqüentemente como tratamento principal. Vem sendo empegada com sucesso quando é impossível evitar-se o alérgeno. Um tratamento de dessensibilização de alérgenos típico incorpora a injeção subcutânea de alérgeno estéril em doses crescentes uma ou duas vezes por semana até atingir-se dose que produza pequena área local temporária de inflamação no local da injeção. A dose é fornecida em seguida em programa de manutenção uma vez a cada duas a quatro semanas. A dessensibilização alérgica é mais freqüentemente utilizada no tratamento de asma alérgica e rinite alérgica, embora tenha apresentado sucesso no tratamento de anafilaxia. A dessensibilização também vem sendo utilizada efetivamente através do uso de adjuvantes, tais como adjuvante de Freund incompleto, que é uma emulsão de antígeno aquoso em óleo mineral. O efeito fisiológico cria um depósito líquido

PI0403964

insolúvel do qual gotículas de alérgeno são gradualmente liberadas. Outra forma de dessensibilização de alérgenos é a polimerização de alérgenos monoméricos com glutaraldeído para criar uma molécula com alergenicidade relativamente baixa (ou seja, causa reação alérgica), enquanto retém grau eficaz de imunogenicidade.

G. DOSAGENS FARMACÊUTICAS:

As dosagens e concentrações desejadas da droga de composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem variar, dependendo da utilização específica desejada. A determinação da dosagem ou via de administração apropriada encontra-se dentro do conhecimento dos técnicos comuns. Experiências com animais proporcionam orientações confiáveis para a determinação de doses eficazes para terapia humana. O escalonamento inter-espécies de doses eficazes pode ser realizado seguindo-se os princípios descritos por Mordenti, J. e Chappell, W., *The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics* em *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al, Eds., Pergamon Press, Nova Iorque, Estados Unidos, 1989, págs. 42 a 46.

Ao empregar-se administração *in vivo* dos polipeptídeos ou anticorpos descritos no presente, as quantidades normais de dosagem podem variar de cerca de cerca de 10 ng/kg até cerca de 100 mg/kg de peso do corpo do mamífero ou mais por dia, preferencialmente cerca de 1 mg/kg/dia a 10 mg/kg/dia, dependendo da via de administração. Orientação sobre as dosagens específicas e métodos de fornecimento é fornecida na literatura; vide, por exemplo, Patentes US 4.657.760, US 5.206.344 ou US 5.225.212. Encontra-se dentro do escopo da presente invenção que formulações diferentes serão eficazes para tratamentos diferentes e diferentes disfunções, e que a administração destinada a tratar um órgão ou tecido específico pode necessitar de fornecimento de maneira diferente daquela de outro órgão ou

PI0403964

tecido. Além disso, as dosagens podem ser administradas através de uma ou mais administrações separadas, ou de infusão contínua. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra supressão desejada dos sintomas da doença. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado através de métodos e testes convencionais.

H. ADMINISTRAÇÃO DA FORMULAÇÃO:

As formulações de acordo com a presente invenção, que incluem mas sem limitar-se a formulações reconstituídas, são administradas a mamíferos necessitados de tratamento com a proteína, preferencialmente seres humanos, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa na forma de mistura ou através de infusão contínua ao longo de um período de tempo, através de vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinhal, subcutânea, intraarticular, intrassinovial, intratecal, oral, local ou inalatória.

Em realizações preferidas, as formulações são administradas ao mamífero através de administração subcutânea (ou seja, abaixo da pele). Para estes propósitos, a formulação pode ser injetada utilizando-se uma seringa. Entretanto, são disponíveis outros dispositivos para administração da formulação, tais como dispositivos de injeção (por exemplo, os dispositivos Inject-ease® e Genject®); canetas injetoras (tais como GenPen®); dispositivos autoinjetores, dispositivos sem agulha (tais como MediJector® e BioJector®); e sistemas de fornecimento de emplastros subcutâneos.

Em realização específica, a presente invenção refere-se a kits para uma unidade de administração de dose única. Esses kits compreendem um recipiente com formulação aquosa de anticorpo ou proteína terapêutica, que incluem seringas previamente cheias com uma ou mais câmaras.

PI0403964

102

Exemplos de seringas previamente cheias são disponíveis através da Vetter GmbH, Ravensburg, Alemanha.

A dosagem apropriada ("quantidade terapeuticamente eficaz") da proteína dependerá, por exemplo, da condição a ser tratada, da severidade e do transcurso da condição, se a proteína é administrada para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do paciente e reação à proteína, tipo de proteína utilizado e critério do método atendente. A proteína é adequadamente administrada ao paciente por uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos e pode ser administrada ao paciente a qualquer momento a partir do diagnóstico em diante. A proteína pode ser administrada como tratamento único ou em conjunto com outras drogas ou terapias úteis no tratamento da condição em questão.

Quando a proteína selecionada for um anticorpo, cerca de 0,1 a 20 mg/kg é dose inicial possível para administração ao paciente se, por exemplo, através de uma ou mais administrações separadas. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado através de técnicas convencionais.

Os usos de formulação anti-IgE (tal como rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) incluem o tratamento ou profilaxia de doenças alérgicas mediadas por IgE, infecções parasíticas, cistite intersticial e asma, por exemplo. Dependendo da doença ou disfunção a ser tratada, quantidade terapeuticamente eficaz (tal como cerca de 1 a 15 mg/kg) do anticorpo anti-IgE é administrada ao paciente.

I. ARTIGOS MANUFATURADOS:

Em outra realização da presente invenção, é fornecido um artigo manufaturado que contém a formulação e fornece preferencialmente instruções para o seu uso. O artigo manufaturado compreende um recipiente. Os recipientes apropriados incluem, por exemplo, garrafas, ampolas (tais como

PI0403964

ampolas de câmara dupla), seringas (tais como seringas de câmara única ou dupla) e tubos de ensaio. O recipiente pode ser formado a partir de uma série de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém a formulação e o rótulo sobre o recipiente, ou a ele associado, pode indicar instruções de reconstituição e/ou uso. O rótulo pode ainda indicar que a formulação é útil ou destinada a administração subcutânea. O recipiente que contém a formulação pode ser uma ampola de múltiplo uso, que permite administrações repetidas (tais como de duas a seis administrações) da formulação reconstituída. O artigo manufaturado pode compreender adicionalmente um segundo recipiente que compreende um diluente apropriado (tal como BWFI). Mediante a mistura do diluente e da formulação liofilizada, a concentração final de proteína será geralmente de pelo menos 50 mg/ml. O artigo manufaturado pode incluir adicionalmente outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, que incluem outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso.

A presente invenção será compreendida mais completamente através de referência aos exemplos a seguir. Eles não deverão, contudo, ser interpretados como limitadores do escopo da presente invenção. Todas as citações ao longo do relatório descritivo são expressamente incorporadas ao presente como referência.

Em outra realização, a presente invenção fornece um artigo manufaturado que compreende as formulações descritas no presente para administração em dispositivo autoinjetor. Um autoinjetor pode ser descrito como dispositivo de injeção que, mediante ativação, fornecerá o seu conteúdo sem ação necessária adicional do paciente ou administrador. Eles são particularmente apropriados para a automedicação de formulações terapêuticas quando a taxa de fornecimento necessitar ser constante e o tempo de fornecimento for de mais que alguns momentos.

PI0403964

EXEMPLO 1

PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÃO ANTI-IGE RHUMABE25 ("E25"):

As formulações do anticorpo anti-IgE monoclonal rhuMAbE25 foram preparadas a partir de E25 a granel, lote residual K9094A (40 mg/ml de rhuMAb E25, 85 mM de trehalose, 5 mM de histidina, pH 6, 0,01% de Tween 20) ou conjunto Q de rhuMAbE25 (5 mg/ml de rhuMAb E25, 25 mM de Tris, 200 mM de NaCl).

Soluções aquosas de rhuMAbE25 foram preparadas através de diálise em tampões dieferentes (20 mM de His-HCl e 200 mM de Arg-HCl, pH 6,0) a 2-8 °C, utilizando Conjunto de Diálise e Lisador Slide A (Pierce). As amostras foram transferidas em seguida para o reservatório de amostra de um microconcentrador por centrifugação Centricon-30 (Amicon). As proteínas foram concentradas através de fiação do concentrador Centricon-3 a 4000 até 5000 g até atingir-se a concentração de proteína desejada.

As amostras foram concentradas em seguida até cerca de 150 mg/ml de rhuMAb E25 utilizando ultrafiltragem. Tween 20 foi adicionado a cada preparação até concentração final de 0,02%. Todas as formulações foram filtradas, enchidas assepticamente em ampolas FormaVitrum de 3 cc e tampadas com tampas Diakyo de 13 mM em sala Classe 100.

EXEMPLO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudos de estabilidade: todas as formulações foram preenchidas em 1 ml em ampolas de vidro FormaVitrum de 3 cc e tampadas com tampas Diakyo de 13 mm em suíte de enchimento estéril Classe 100. As ampolas foram colocadas a -70, 2 a 8, 15, 30 e 40 °C em recipientes impermeáveis à luz.

Estudo de agitação: parcelas de cada formulação foram colocadas nas ampolas de vidro. As ampolas foram agitadas horizontalmente

PI0403964

em Agitador Superior de Bancada Glas-Col à temperatura ambiente. O agitador foi ajustado em 70 com comprimento de braço de 30 cm (máximo). Após agitação, as amostras foram inspecionadas e analisadas de acordo com o protocolo a seguir.

Estudo de congelamento e descongelamento: amostras de E25 sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento. Cada ciclo consistiu de congelamento a -70 °C por uma noite e descongelamento subseqüente à temperatura ambiente por cerca de uma hora. Após cada ciclo, as amostras foram inspecionadas visualmente utilizando uma caixa leve para determinar a cor e a claridade do líquido. A turbidez e agregados solúveis foram medidos de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Métodos analíticos: amostras de estabilidade foram analisadas através dos métodos descritos na Tabela 1.

TABELA 1

MÉTODOS ANALÍTICOS

Teste	Finalidade
Cor, clareza, aparência[a]	Inspeção visual de formulações líquidas
Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)[b]	Mede o percentual de monômero, agregados solúveis e componentes de baixo peso molecular
Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)[c]	Mede o nível de isomerização de Asp-32 e tiol livre
Varrimento de UV Spec (gravimétrico)[f]	Mede a concentração de proteína
Turbidez (diâmetro externo médio de 340 a 360 nm)[d]	Mede agregados solúveis e insolúveis
Atividade[e]	Determina a atividade de ligação de anti-IgE

[A] APROVADO PARA COR, APARÊNCIA E CLARIDADE:

A cor, aparência e claridade da amostra foram determinadas visualmente contra o fundo branco e preto da inspeção e comparados com

PI0403964

volume igual de controle negativo. As amostras deverão ser cuidadosamente giradas para garantir mistura homogênea, mas não tão vigorosamente de forma a criar bolhas de ar.

[B] CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHO:

Foi utilizada coluna TSK SUPER SW3000 (4,6 x 300 mm) em sistema de cromatografia HP 1100. A coluna foi carregada com 20 µg de proteína e eluída em 0,1 M de fosfato de potássio, pH 6,8. A amostra foi medida a 280 nm por um detector de UV.

[C] CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA (HIC):

Os experimentos de HIC foram conduzidos através da utilização de coluna TSK Fenil-5PW (7,5 x 75 mm) (TosoHaas) em um sistema de cromatografia de líquidos HP 1100. A coluna foi carregada com 28 µg de fragmentos de Fab digeridos por papaína e eluída com gradiente de concentração de sulfato de amônio em tampão de 20 mM de Tris de 2 M a 0 M. Os picos foram monitorados a 210 nm por um detector de UV.

[D] TURBIDEZ:

A turbidez das amostras foi determinada em cubeta com comprimento de trajeto de 1 cm, utilizando espectrômetro HP. A turbidez foi calculada como absorção média de 340 a 360 nm.

[E] A atividade do anticorpo monoclonal anti-IgE foi determinada através de teste de inibição da ligação de receptores. As amostras foram diluídas até encontrar-se dentro da faixa da curva padrão de 100 e 1,56 µg/ml em diluente de teste contendo tampão de fosfato, BSA a 0,5%, polissorbato 20 a 0,05% e Timerosol a 0,01%. Uma placa de microtítulos foi revestida com receptor de IgE, incubada em seguida com a IgE-biotina e amostra anti-IgE diluída. A quantidade de IgE-biotina ligada ao receptor que se correlacionou com a atividade de anticorpo monoclonal anti-IgE foi medida utilizando Estreptavidina-HRP. Os dados foram analisados utilizando um programa de

PI0403964

adequação de curva logística de quatro parâmetros.

[f] A concentração de anticorpo foi obtida em um espectrofotômetro de conjunto de diodos Hewlett Packard 8453 com cubeta de quartzo de 1 cm. A concentração foi calculada utilizando absorção de 1,5 cm^{-1} $(mg/ml)^{-1}$.

RESUMO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS:

Formulações	Faixas de proteína	Tampão/faixas	Excipientes/faixas
80 mg/ml de E25 50 mM de histidina-HCl 150 mM de trehalose 0,05% de polissorbato 20 pH 6,0	40-150 mg/ml	His-HCl ou His-acetato Faixas: 10 mM - 100 mM	Trehalose ou sacarose Faixas de açúcar: 20 mM a 350 mM Polissorbato: 0,01% a 0,1%
150 mg/ml de E25 20 mM de histidina-HCl 200 mM de ArgHCl 0,02% de polissorbato 20 pH 6,0	40-260 mg/ml	His-HCl ou His-acetato Faixas: 10 mM - 100 mM	Faixas de ArgHCl: 50 mM a 200 mM Polissorbato: 0,01% a 0,1%

Dados de estabilidade para 150 mg/ml de E25 em formulação de histidina e ArgHCl:

Temp. (°C)	Tempo (meses)	Visual	pH	SEC[a] % monômero	HIC[b] % do principal	Potência[c]	Turbidez[d]
5	0	Aprov.	6,2	99,0	64	106	0,25
	1	Aprov.	6,0	99,2	63	100	0,27
	3	Aprov.	6,0	99,3	63	111	0,25
	16	Aprov.	6,0	98,9	62	83	0,27

PI0403964

Temp. (°C)	Tempo (meses)	Visual	pH	SEC[a] % monômero	HIC[b] % do principal	Potência[c]	Turbidez[d]
30	1	Aprov.	5,9	98,43	54	91	0,25
	3	Aprov.	6,1	97,53	42	65	0,30
	16	Aprov.	6,0	90,63	19	28	0,54

Dados de estabilidade para 80 mg/ml de E25 em formulação de histidina e trehalose:

Temp. (°C)	Tempo (meses)	Visual	pH	SEC[a] % monômero	HIC[b] % do principal	Potência[c]	Turbidez[d]
5	0	Aprov.	5,7	99,1	64	100	0,20
	1	Aprov.	5,8	98,7	63	92	0,20
	3	Aprov.	5,7	98,8	63	124	0,20
	6	Aprov.	5,7	99,1	63	97	0,21
	14	Aprov.	5,7	99,0	62	83	0,21
	24	Aprov.	5,7	98,8	62	84	0,20
30	1	Aprov.	5,8	98,7	55	77	0,20
	3	Aprov.	5,7	97,4	41	76	0,29
	6	Aprov.	5,8	95,5	31	48	0,38
	14	Aprov.	5,7	93,1	22	30	0,48

a. Cromatografia de exclusão de tamanho para a medição de agregados solúveis e fragmentos.

b. Cromatografia de interação hidrofóbica para E25 digerido por papaína.

c. Teste de inibição de ligação de receptores de IgE.

d. Diâmetro externo médio (340 a 360 nm).

PI0403964

ESTUDO DE AGITAÇÃO:

	TO			Agitação após três dias		
Formulação	Visual	SEC (% monômero)	Turbidez	Visual	SEC (% monômero)	Turbidez
1	Aprov.	99,5	0,18	Aprov.	99,3	0,18
2	Aprov.	99,0	0,19	Aprov.	99,4	0,19

Formulação 1: 156 mg/ml de E25, 200 mM de ArgCl, 23 mM de His, 0,02% T20.

Formulação 2: 150 mg/ml de E25, 182 mM de ArgCl, 20 mM de His, 0,02% T20.

ESTUDO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO:

	TO			Após o primeiro ciclo			Após o terceiro ciclo		
Form.	Visual	SEC % monôm.	Turv.	Visual	SEC % monôm.	Turv.	Visual	SEC % monôm.	Turv.
1	Aprov.	99,5	0,18	Aprov.	99,3	0,17	Aprov.	99,4	0,17
2	Aprov.	99,0	0,19	Aprov.	99,2	0,19	Aprov.	99,2	0,18

Formulação 1: 156 mg/ml de E25, 200 mM de ArgCl, 23 mM de His, 0,02% T20.

Formulação 2: 150 mg/ml de E25, 182 mM de ArgCl, 20 mM de His, 0,02% T20.

EXEMPLO 3

Amostras de formulações líquidas do anticorpo monoclonal anti-IgE (E26) foram preparadas em 20 mM de tampões e armazenadas em seguida a 30 °C e 40 °C. A estabilidade de E26 foi determinada através de cromatografia e medições da atividade. A cromatografia de exclusão de tamanho foi utilizada para determinar os agregados solúveis e a cromatografia de interação hidrofóbica de amostra digerida por pepsina foi utilizada para

PI0409864
110

medir a isomerização. A atividade da amostra foi monitorada através do uso de um teste de inibição da ligação de receptor de IgE. Conforme exibido nas Figuras 1, 2 e 3, a degradação de E26 é altamente dependente do pH dos tampões. O E26 aparentemente é mais estável em pH de cerca de 6,0.

EXEMPLO 4

A formação de particulados é desafio importante para fabricar a formulação líquida sob alta concentração, pois ela normalmente aumenta com o aumento da concentração de proteína sob condições tensionadas. A Figura 4 exibe o resultado do estudo de agitação para formulação líquida de E26 concentrada. A formulação foi preparada em 20 mM de succinato, 192 mM de trehalose sob pH 6,0 com concentração diferente de polissorbato 20. A formulação particulada foi monitorada através da medição da turbidez. O resultado demonstra que a turbidez da solução E26 aumenta com o tempo de agitação. A adição de pelo menos 0,01% de polissorbato é essencial para reduzir a formação de particulado sob a condição tensionada. Resultados similares também foram observados para formulação líquida de E25 concentrada.

EXEMPLO 5

A Figura 5 exibe a formulação líquida de 150 mg/ml de E25 preparados através da reconstituição do E25 liofilizado. O aumento da concentração de sal inibe a formação de particulado reversível e resulta na redução da leitura da turbidez. Dentre todos os sais testados, a formulação com Arg-HCl aparentemente possui a menor turbidez. O efeito da concentração de sal sobre a redução da leitura de turbidez também foi observado para E25 preparado utilizando processo de TFF.

EXEMPLO 6

A formulação líquida de E25 na presença de ArgHCl aparentemente também possui melhor estabilidade que outras formulações

PI0403964

líquidas. As Figuras 6 e 7 exibem o estudo de estabilidade de E25 a 150 mg/ml em formulações líquidas que contêm ArgHCl, $CaCl_2$ e $MgCl_2$. Para formulações líquidas que contêm ArgHCl com ou sem sacarose, existe pouca diferença na sua estabilidade em termos de turbidez, isomerização e fragmentação. As formulações líquidas que contêm ArgHCl são mais estáveis que a formulação que contém $MgCl_2$ e $CaCl_2$.

EXEMPLO 7

A Figura 8 exibe os resultados de um estudo de estabilidade de formulação líquida E25 com formulações de acetato e histidina. A formulação com histidina possui pH mais alto que a formulação de acetato. Os resultados demonstraram claramente que o E25 em formulação líquida de ArgHCl e histidina é mais estável que sob outras condições.

EXEMPLO 8

A alta concentração de E25 pode formar gel sólido na presença de certos íons, tais como citrato, succinato e sulfato (Tabela I), particularmente sob temperatura de armazenagem de 2 a 8 °C. O uso de arginina-HCl como excipiente permite-nos formular E25 até mais de 200 mg/ml sem a formação de gel ou precipitado.

TABELA 1

EFEITO DE VÁRIOS EXCIPIENTES SOBRE A FORMAÇÃO DE GEL DE E25 A 125 MG/ML, pH DE CERCA DE 6,0

Excipiente	Concentração de excipiente MM	Preparação	Turbidez a T0 (340-360 nm)	Concentração de anticorpos mg/ml	Aparência visual
SWFI		Lyo Recon	0,21	125	Transp.
NaCl	188	Lyo Recon	0,25	125	Transp.
Succinato	94	Lyo Recon	0,31	125	Gel
Succinato	19	Lyo Recon	0,28	125	Gel

PI0403964

Excipiente	Concentração de excipiente MM	Preparação	Turbidez a T0 (340-360 nm)	Concentração de anticorpos mg/ml	Aparência visual
Citrato	188	Lyo Recon	Pendente	125	Gel
Citrato	19	Lyo Recon	Pendente	125	Gel
Na_2SO_4	Pendente	Lyo Recon	Pendente	125	Gel
Na_2SO_4	Pendente	Lyo Recon	Pendente	125	Opalesc.
Fosfato	Pendente	Lyo Recon	Pendente	125	Opalesc.
Acetato	188	Lyo Recon	Pendente	125	Transp.
Acetato	94	Lyo Recon	Pendente	125	Transp.
Acetato	19	Lyo Recon	Pendente	125	Transp.
Histidina	94	Lyo Recon	0,19	125	Transp.
Histidina	47	Lyo Recon	0,24	125	Transp.
Arginina-HCl	150	Lyo Recon	0,25	137	Transp.
Arginina-HCl	200	TFF	0,19	162	Transp.
Arginina-SO_4	150	Lyo Recon	0,27	137	Gel
$CaCl_2$	125	TFF	0,32	147	Transp.
$MgCl_2$	125	TFF	0,48	147	Opalesc.

EXEMPLO 9

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA OU ANTICORPO EM *E. COLI*:

Este exemplo ilustra a preparação de forma não glicosilada de uma proteína desejada ou anticorpo através da expressão recombinante de *E. coli*.

A seqüência de DNA que codifica o anticorpo ou proteína desejada é inicialmente amplificada utilizando primers de PCR selecionados. Os primers deverão conter locais de enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição sobre o vetor de expressão selecionado. Pode ser empregada uma série de vetores de expressão. Um exemplo de vetor

PI0403964

apropriado é pBR322 (derivado de *E. coli*; vide Bolivar et al, *Gene*, 2: 95 (1977)), que contém genes para resistência a tetraciclina e ampicilina. O vetor é digerido com enzima de restrição e desfosforilado. As seqüências amplificadas por PCR são ligadas em seguida ao vetor. O vetor incluirá preferencialmente seqüências que codificam um gene de resistência a antibióticos, promotor de trp, líder póli-his (que inclui os primeiros seis códons STII, seqüência póli-his e local de divisão de enteroquinase), a região de codificação do anticorpo ou proteína desejada, terminal de transcrição lambda e gene argU. Além disso, o vetor pode incluir pelo menos partes não significativas das seções 5' e 3' não traduzidas do ácido nucleico de seqüência nativa que codifica o anticorpo ou a proteína desejada.

A mistura de ligação é utilizada em seguida para transformar uma linhagem de *E. coli* selecionada, utilizando os métodos descritos em Sambrook et al, acima. Os transformadores são identificados através da sua capacidade de crescimento sobre placas LB e as colônias resistentes a antibióticos são selecionadas em seguida. DNA de plasmídeo pode ser isolado e confirmado através de análise de restrição e seqüenciamento de DNA.

Clones selecionados podem ser cultivados por uma noite em meio de cultivo líquido tal como caldo de LB suplementado com antibióticos. O cultivo por uma noite pode ser utilizado em seguida para inocular cultivo em escala maior. As células são cultivadas em seguida até densidade ótica desejada, durante a qual o promotor de expressão é ligado.

Após o cultivo das células por várias horas mais, as células podem ser colhidas através de centrifugação. A pelota celular obtida através da centrifugação pode ser solubilizada utilizando vários agentes conhecidos na técnica e a proteína desejada solubilizada ou anticorpo pode ser purificado em seguida, utilizando coluna quelante metálica sob condições que permitem a firme ligação do anticorpo ou proteína solubilizada.

PI0402964

O anticorpo ou proteína desejada pode ser expressa em *E. coli* em forma marcada por póli-his, utilizando o procedimento a seguir. O DNA codificador do anticorpo ou proteína desejada é inicialmente amplificado, utilizando primers de PCR selecionados. Os primers conterão locais de enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição sobre o vetor de expressão selecionado e outras seqüências úteis que proporcionam início de tradução eficiente e confiável, purificação rápida sobre coluna de quelação metálica e remoção proteolítica com enteroquinase. As seqüências marcadas com póli-his amplificadas por PCR são ligadas em seguida em um vetor de expressão, que é utilizado para transformar um hospedeiro *E. coli* com base na linhagem 52 (W3110 fuhA (tonA) lon galE rpoHts (htpRts) clpP (laclq). Os transformadores são cultivados em primeiro lugar em LB que contém 50 mg/ml de carbenicilina a 30EC com agitação até atingir-se OD600 de 3 a 5. Os cultivos são diluídos em seguida de 50 a 100 vezes em meios CRAP (preparados através da mistura de 3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato de sódio $2H_2O$, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extrato de levedura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF em 500 ml de água, bem como 110 mM de MPOS, pH 7,3, 0,55% (p/v) de glicose e 7 mM de $MgSO_4$) e cultivados por cerca de vinte a trinta horas a 30EC com agitação. As amostras são removidas para verificar a expressão atarvés de análise SDS-PAGE e o cultivo a granel é centrifugado para peletizar as células. As pelotas celulares são congeladas até a purificação e redobra.

Pasta de *E. coli* de fermentações de 0,5 a 1 l (pelotas de 6 a 10 g) é novamente suspensa em dez volumes (p/v) em tampão de 7M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 8. Sulfito de sódio sólido e tetrationato de sódio é adicionado para elaborar concentrações finais de 0,1 M e 0,02 M, respectivamente, e a solução é agitada por uma noite a 4EC. Esta etapa resulta em proteína desnaturada com todos os resíduos de cisteína bloqueados

PI0403964

através de sulfitolização. A solução é centrifugada a 40.000 rpm em Ultracentrifugador Beckman por trinta minutos. O sobrenadante é diluído com três a cinco volumes de tampão de coluna de quelato metálico (6M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4) e filtrado através de filtros de 0,22 micra para clarificação. O extrato clarificado é carregado sobre uma coluna de 5 ml de quelato metálico Qiagen Ni-NTA equilibrada no tampão de coluna de quelato metálico. A coluna é lavada com tampão adicional contendo 50 mM de imidazol (Calbiochem, grau Utrol), pH 7,4. A proteína é eluída com tampão que contém 250 mM de imidazol. Frações que contêm a proteína desejada são reunidas e armazenadas a 4EC. A concentração de proteína é estimada através da sua absorção a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção calculado com base na sua seqüência de aminoácidos.

As proteínas são novamente dobradas através de lenta diluição da amostra em tampão de redobra recém preparado que consiste de: 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de uréia, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina e 1 mM de EDTA. Os volumes de redobra são selecionados de tal forma que a concentração final de proteína seja de 50 a 100 μg/ml. A solução em redobra é agitada suavemente a 4EC por 12 a 36 horas. A reação de redobra é resfriada através da adição de TFA até concentração final de 0,4% (pH de cerca de 3). Antes da purificação adicional da proteína, a solução é filtrada através de filtro de 0,22 micra e adiciona-se acetonitrila até concentração final de 2 a 10%. A proteína redobrada é cromatografada sobre coluna de fase reversa Poros R1/H utilizando tampão móvel de TFA a 0,1% com eluição com gradiente de acetonitrila de 10 a 80%. Parcelas de frações com absorção A280 são analisadas sobre géis de SDS poliacrilamida e frações que contêm proteína redobrada homogênea são reunidas. Geralmente, a espécie dobrada adequadamente da maior parte das proteínas é eluída sob as concentrações mais baixas de acetonitrila, pois estas espécies são as mais compactas com

PI0403964

seus interiores hidrofóbicos isolados contra interação com a resina de fase reversa. Espécies agregadas são normalmente eluídas em concentrações de acetonitrila mais altas. Além da resolução de formas mal dobradas de proteínas da forma desejada, a etapa de fase reversa também remove endotoxina das amostras.

Frações que contêm o anticorpo ou proteína desejada dobrada são reunidas e a acetonitrila é removida utilizando suave fluxo de nitrogênio dirigido à solução. As proteínas são formuladas em 20 mM de Hepes, pH 6,8 com 0,14 M de cloreto de sódio e manitol a 4% através de diálise ou filtragem de gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas no tampão de formulação e filtradas estéreis.

EXEMPLO 10

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA OU ANTICORPO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS:

Este exemplo ilustra a preparação de formas potencialmente glicosiladas do anticorpo ou proteína desejada através de expressão recombinante em células de mamíferos.

O vetor, pRK5 (vide a Patente EP 307.247, publicada em quinze de março de 1989), é empregado como o vetor de expressão. Opcionalmente, DNA que codifica o anticorpo ou proteína desejada é ligado a pRK5 com enzimas de restrição selecionadas para permitir a inserção desse DNA utilizando métodos de ligação tais como os descritos em Sambrook et al, acima.

Em uma realização, as células hospedeiras selecionadas podem ser células 293. Células 293 humanas (ATCC CCL 1573) são cultivadas até a confluência em placas de cultivo de tecidos em meios tais como DMEM suplementado com soro de feto de bezerro e, opcionalmente, componentes de nutrientes e/ou antibióticos. Cerca de 10 μg de DNA que codifica o anticorpo ou proteína desejada ligado a pRK5 são misturados com cerca de 1 μg de DNA

PI0403984

11Y

que codifica o gene VA RNA (Thimmappaya et al, *Cell*, 31: 543 (1982)) e dissolvidos em 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de $CaCl_2$. A esta mistura, adiciona-se em gotas 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de $NaPO_4$ e permite-se a formação de um precipitado por dez minutos a 25 °C. O precipitado é suspenso, adicionado às células 293 e mantido em deposição por cerca de quatro horas a 37 °C. O meio de cultivo é aspirado e 2 ml de glicerol a 20% em PBS são adicionados por trinta segundos. As células 293 são lavadas em seguida com meio livre de soro, adiciona-se meio novo e as células são incubadas por cerca de cinco dias.

Cerca de 24 horas após as transfecções, o meio de cultivo é removido e substituído com meio de cultivo (isolado) ou meio de cultivo que contém 200 µCi/ml de ^{35}S-cisteína e 200 µCi/ml de ^{35}S-metionina. Após incubação por doze horas, o meio condicionado é recolhido, concentrado em filtro de fiação e carregado sobre gel de SDS a 15%. O gel processado pode ser seco e exposto a filme por período de tempo selecionado para revelar a presença do anticorpo ou proteína desejada. Os cultivos que contêm células transfectadas podem sofrer incubação adicional (em meio livre de soro) e o meio é testado em biotestes selecionados.

Em método alternativo, o anticorpo ou proteína desejada pode ser introduzido em células 293 de forma transitória, utilizando o método de sulfato de dextran descrito por Somparyrac et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 12: 7575 (1981). Células 293 são cultivadas até densidade máxima em frasco agitador e adiciona-se 700 µg de DNA que codifica o anticorpo ou proteína desejada ligada a pRK5. As células são concentradas em primeiro lugar do frasco agitador através de centrifugação e lavadas com PBS. O precipitado de DNA e dextran é incubado sobre a pelota celular por quatro horas. As células são tratadas com glicerol a 20% por noventa segundos, lavadas com meio de

PI0403864

cultivo de tecido e reintroduzidas no frasco agitador que contém meio de cultivo de tecidos, 5 μg/ml de insulina bovina e 0,1 μg/ml de transferrina bovina. Após cerca de quatro dias, os meios condicionados são centrifugados e filtrados para remover células e fragmentos. A amostra que contém a proteína ou anticorpo desejado expresso pode ser concentrada e purificada em seguida através de qualquer método selecionado, tal como diálise e/ou cromatografia de coluna.

Em outra realização, o anticorpo ou proteína desejada pode ser expresso em células de CHO. O DNA que codifica o anticorpo ou proteína desejada ligada a pRK5 pode ser transfectado em células de CHO utilizando reagentes conhecidos tais como $CaPO_4$ ou DEAE-dextran. Conforme descrito acima, os cultivos celulares podem ser incubados e o meio substituído com meio de cultivo (isolado) ou meio que contém uma radiomarca tal como ^{35}S-metionina. Após determinar a presença do anticorpo ou proteína desejada, o meio de cultivo pode ser substituído com meio livre de soro. Preferencialmente, os cultivos são incubados por cerca de seis dias e, em seguida, o meio condicionado é colhido. O meio que contém o anticorpo ou proteína desejada expressa pode ser concentrado e purificado em seguida através de qualquer método selecionado.

Variantes marcadas por epítopo da proteína ou anticorpo desejado podem também ser expressas em células de CHO hospedeiras. O DNA que codifica o anticorpo ou proteína desejada ligado a pRK5 pode ser subclonado do vetor pRK5. O inserto de subclone pode sofrer PCR para fundir na estrutura com uma marca de epítopo selecionada, tal como uma marca póli-his em um vetor de expressão de bacilovírus. O DNA marcado por póli-his que codifica o inserto de anticorpo ou proteína desejada pode ser subclonado em seguida em um vetor dirigido por SV40 que contém um marcador de seleção tal como DHFR para seleção de clones estáveis. Por fim, as células de CHO podem ser transfectadas (conforme descrito acima) com o vetor dirigido por

PI0403964

SV40. A marcação pode ser realizada, conforme descrito acima, para verificar a expressão. O meio de cultivo que contém o anticorpo ou proteína desejada marcada poe póli-His expresso pode ser concentrado e purificado em seguida através de qualquer método selecionado, tal como através de cromatografia de afinidade de Ni^{2+}-quelato.

O anticorpo ou proteína desejada pode também ser expressa em células de CHO e/ou COS através de procedimento de expressão transitória ou em células de CHO através de outro procedimento de expressão estável.

A expressão estável em células de CHO é realizada através da utilização do procedimento a seguir. As proteínas são expressas na forma de construção de IgG (imunoadesina), em que as seqüências de codificação para as formas solúveis (tais como domínios extracelulares) das proteínas correspondentes são fundidas a uma seqüência de região constante de IgG1 que contém os domínios CH2, CH2 e de articulação e/ou é uma forma marcada por póli-His.

Após a amplificação por PCR, os DNAs correspondentes são subclonados em um vetor de expressão de CHO, através da utilização de técnicas padrão conforme descrito em Ausubel et al, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidade 3.16, John Wiley & Sons (1997). São construídos vetores de expressão de CHO para conter locais de restrição 5' e 3' compatíveis do DNA de interesse para permitir o lançamento conveniente de cDNAs. O vetor utilizado na expressão em células CHO é conforme descrito em Lucas et al, *Nucl. Acids Res.* 24: 9 1774-1779 (1996), e utiliza o promotor/amplificador precoce de SV40 para dirigir a expressão do cDNA de interesse e di-hidrofolato reductase (DHFR). A expressão de DHFR permite seleção para manutenção estável do plasmídeo em seguida à transfecção.

Doze microgramas do DNA de plasmídeo desejado são introduzidos em cerca de dez milhões de células de CHO, utilizando reagentes

PI0403964

de transfecção disponíveis comercialmente Superfect® (Quiagen), Dosper® ou Fugene® (Boehringer Mannheim). As células são cultivadas conforme descrito em Lucas et al, acima. Cerca de 3 x 10^{-7} células são congeladas em uma ampola para produção e crescimento adicional conforme descrito abaixo.

As ampolas que contêm o DNA de plasmídeo são derretidas através de colocação em banho de água e misturadas através de turbilhonamento. O conteúdo é colocado através de pipeta em um tubo centrifugador contendo 10 ml de meios e centrifugado a 1000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante é aspirado e as células são novamente suspensas em 10 ml de meios seletivos (0,2 μm de PS20 filtrado com 0,2 μm de soro bovino fetal diafiltrado a 5%). As células são então parceladas em um centrifugador de 100 ml contendo 90 ml de meios seletivos. Após um a dois dias, as células são transferidas para um centrifugador de 250 ml preenchido com 150 ml de meio de crescimento seletivo e incubadas a 37 °C. Após outros dois a três dias, centrifugadores de 250 ml, 500 ml e 2000 ml são semeados com 3 x 10^5 células/ml. O meio celular é substituído com meios novos através de centrifugação e re-suspensão em meio de produção. Embora qualquer meio de CHO apropriado possa ser empregado e pode ser utilizado na realidade um meio de produção descrito na Patente US 5.122.469, emitida em 16 de junho de 1992. Um centrifugador de produção de três litros é semeado a 1,2 x 10^6 células/ml. No dia 0, é determinado o número de células e o pH. No dia 1, o centrifugador é amostrado e inicia-se o espargimento com ar filtrado. No dia 2, o centrifugador é amostrado, a temperatura modificada para 33 °C e foram retirados 30 ml de glicose a 500 g/l e 0,6 ml de antiespumante a 10% (por exemplo, emulsão de polidimetilsiloxano a 35%, Emulsão de Grau Médico 365 da Dow Corning). Ao longo da produção, o pH é ajustado conforme o necessário para mantê-lo em volta de 7,2. Após dez dias, ou até que a viabilidade caísse abaixo de 70%, o cultivo celular é colhido através de

PI0403964

centrifugação e filtragem através de um filtro de 0,22 μm. O filtrado foi armazenado a 4 °C ou carregado imediatamente sobre colunas para purificação.

Para as construções marcadas com póli-His, as proteínas são purificadas utilizando uma coluna de Ni-NTA (Qiagen). Antes da purificação, adiciona-se imidazol aos meios condicionados até concentração de 5 mM. Os meios condicionados são bombeados em uma coluna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada a 4 °C, em 20 mM de Hepes, pH 7,4, tampão contendo 0,3 M de NaCl e 5 mM de imidazol em velocidade de fluxo de 4 a 5 ml/min. Após carregamento, a coluna é lavada com tampão de equilíbrio adicional e a proteína foi eluída com tampão de equilíbrio contendo 0,25 M de imidazol. A proteína altamente purificada é subseqüentemente dessalinizada em um tampão de armazenagem contendo 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl e manitol a 4%, pH 6,8, com uma coluna de 25 ml de G25 Superfino (Pharmacia) e armazenada a -80 °C.

Construções de imunoadesina (contendo Fc) são purificadas a partir dos meios condicionados conforme segue. O meio condicionado é bombeado em uma coluna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que havia sido equilibrada em 20 mM de tampão fosfato de Na, pH 6,8. Após o carregamento, a coluna é lavada extensamente com tampão de equilíbrio antes da eluição com 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. A proteína eluída é imediatamente neutralizada através do recolhimento de frações de 1 ml em tubos contendo 275 μl de 1 M de tampão Tris, pH 9. A proteína altamente purificada é subseqüente dessalinizada em tampão de armazenagem conforme descrito acima para as proteínas marcadas por póli-His. A homogeneidade é determinada através de géis de SDS poliacrilamida e seqüenciamento de aminoácidos N-terminais por degradação de Edman.

PI0403964

EXEMPLO 11

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA OU ANTICORPOS EM LEVEDURA:

O método a seguir descreve a expressão recombinante da proteína ou anticorpo desejado em levedura.

Em primeiro lugar, são construídos vetores de expressão de levedura para a produção intracelular ou secreção da proteína ou anticorpo desejado do promotor de ADH2/GAPDH. DNA codificador da proteína ou anticorpo desejado e o promotor é inserido em locais de enzimas de restrição apropriados no plasmídeo selecionado, a fim de dirigir a expressão intracelular. Para a secreção, DNA codificador da proteína ou anticorpo desejado pode ser clonado no plasmídeo selecionado, juntamente com DNA codificador do promotor de ADH2/GAPDH, um peptídeo de sinal nativo ou outro peptídeo de sinal de mamífero ou, por exemplo, uma seqüência líder/sinal de secreção de invertase ou fator alfa de levedura, e seqüências de ligação (se necessário) para a expressão da proteína ou anticorpo desejado.

Células de leveduras, tais como linhagem de levedura AB110, podem ser transformadas em seguida com os plasmídeos de expressão descritos acima e cultivadas em meios de fermentação selecionados. Os sobrenadantes de levedura transformados podem ser analisados através de precipitação com ácido tricloroacético a 10% e separação através de SDS-PAGE, seguida por manchas dos géis com manchas de Azul de Coomassie.

A proteína ou anticorpo recombinante pode ser subseqüentemente isolado e purificado através de remoção das células de levedura do meio de fermentação, através de centrifugação e concentração do meio em seguida, utilizando-se filtros de cartuchos selecionados. O concentrado que contém o anticorpo ou proteína recombinante pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia de coluna selecionadas.

PI0403964

EXEMPLO 12

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA OU ANTICORPO EM CÉLULAS DE INSETOS INFECTADAS POR BACILOVÍRUS:

O método a seguir descreve a expressão recombinante da proteína ou anticorpo desejado em células de insetos infectadas por bacilovírus.

A codificação de seqüência para a proteína ou anticorpo desejado é fundida antes de uma marca de epítopo contida em um vetor de expressão de bacilovírus. Essas marcas de epítopos incluem marcas póli-his e marcas de imunoglobulina (como regiões Fc de IgG). Uma série de plasmídeos pode ser empregada, incluindo plasmídeos derivados de plasmídeos disponíveis comercialmente, tais como pVL1393 (Novagen). Resumidamente, a seqüência codificadora da porção desejada da proteína ou anticorpo, tal como a seqüência codificadora do domínio extracelular de uma proteína transmembranosa ou da seqüência codificadora da proteína madura, caso a proteína seja extracelular, é amplificada através de PCR com primers complementares às regiões 5' e 3'. O "primer" 5' pode incorporar locais de enzimas de restrição laterais (selecionados). O produto é digerido em seguida com as enzimas de restrição selecionadas e subclonado no vetor de expressão.

Bacilovírus recombinante é gerado através de cotransfecção do plasmídeo acima e DNA viral BaculoGold® (Pharmingen) em células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711), utilizando lipofectina (disponível comercialmente através da GIBCO-BRL). Após quatro a cinco dias de incubação a 28 °C, os vírus liberados são colhidos e utilizados para amplificações adicionais. Expressão de proteínas e infecção viral são realizadas conforme descrito por O'Reilley et al, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford, Inglaterra: Oxford University Press

PI0403984

(1994).

Proteína ou anticorpo marcado por póli-his expresso pode ser purificado em seguida, por exemplo, através de cromatografia de afinidade de Ni^{2+}-quelato conforme segue. São preparados extratos a partir de células Sf9 infectadas por vírus recombinantes, conforme descrito por Rupert et al, *Nature*, 362: 175-179 (1993). Resumidamente, as células Sf9 são lavadas, novamente suspensas em tampão de sonicação (25 ml de Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de EDTA; 10% de glicerol; 0,1% de NP-40; 0,4 M de KCl) e sonicadas por duas vezes por vinte segundos sobre gelo. Os sonicados são limpos através de centrifugação e o sobrenadante é diluído cinqüenta vezes em tampão de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, 10% de glicerol, pH 7,8) e filtrado através de um filtro de 0,45 μm. Uma coluna de agarose Ni^{2+}-NTA (disponível comercialmente através da Qiagen) é preparada com volume de leito de 5 ml, lavada com 25 ml de água e equilibrada com 25 ml de tampão de carregamento. O extrato celular filtrado é carregado sobre a coluna a 0,5 ml por minuto. A coluna é lavada até a linha básica A_{280} com tampão de carregamento, quando se inicia o recolhimento de fração pontual. Em seguida, a coluna é lavada com tampão de lavagem secundário (50 mM de fosfato; 300 mM de NaCl, 10% de glicerol, pH 6,0), que elui proteína não especificamente ligada. Após atingir novamente a linha básica A_{280}, a coluna é desenvolvida com 0 a 500 mM de gradiente de imidazol no tampão de lavagem secundário. Frações de 1 ml são recolhidas e analisadas através de SDS-PAGE e manchas de prata ou Western blot com Ni^{2+}-NTA conjugado a fosfatase alcalina (Qiagen). Frações que contêm a proteína ou anticorpo marcado com His_{10} eluído são reunidas e dialisadas contra tampão de carregamento.

Alternativamente, a purificação da proteína ou anticorpo marcado com IgG (ou marcado com Fc) pode ser realizada utilizando técnicas de cromatografia conhecidas, incluindo, por exemplo, cromatografia de coluna de

PI0403964

Proteína A ou Proteína G.

EXEMPLO 13

PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que podem especificamente ligar a proteína de interesse ou o antígeno desejado.

As técnicas de produção dos anticorpos monoclonais são conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, em Goding, acima. Os imunogenes que podem ser empregados incluem proteína desejada ou anticorpo alvo purificado, proteínas de fusão que contêm a proteína desejada ou antígeno alvo e células que expressam essa proteína ou antígeno recombinante sobre a superfície celular. A seleção do imunogene pode ser realizada pelo técnico no assunto sem experimentações indevidas.

Camundongos, tais como Balb/c, são imunizados com o imunogene de proteína desejada ou antígeno alvo emulsificado em adjuvante de Freund completo e injetados por via subcutânea ou intraperitoneal em quantidade de 1 a 100 microgramas. Alternativamente, o imunogene é emulsificado em adjuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton MT, Estados Unidos) e injetado nas almofadas das patas traseiras dos animais. Os camundongos imunizados são então amplificados em dez a doze dias mais tarde com imunogene adicional emulsificado no adjuvante selecionado. Em seguida, por várias semanas, os camundongos podem também ser amplificados com injeções de imunização adicionais. Amostras de soro podem ser obtidas periodicamente dos camundongos através de sangramento retroorbital para testes em ensaios ELISA para a detecção de anticorpos dirigidos para a proteína ou antígeno desejado.

Após a detecção do título de um anticorpo apropriado, os animais "positivos" para anticorpos podem ser injetados com uma injeção intravenosa final da proteína desejada ou antígeno alvo. Três a quatro dias mais tarde, os

PI0403964

camundongos são sacrificados e as células do baço são colhidas. As células do baço são então fundidas (utilizando polietileno glicol a 35%) em uma linhagem celular de mieloma murino selecionada, tal como P3X63AgU.1, disponível através de ATCC, nº CRL 1597. As fusões geram células de hibridoma que podem então ser colocadas em placas sobre placas de cultivo de tecidos com 96 cavidades contendo meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) para inibir a proliferação de células não fundidas, híbridos de mieloma e híbridos de células do baço.

As células de hibridoma são selecionadas em ELISA pela reatividade contra a proteína desejada ou antígeno alvo. A determinação de células de hibridoma "positivas" que segregam esses anticorpos monoclonais encontra-se dentro dos conhecimentos da técnica.

As células de hibridoma positivas podem ser injetadas por via intraperitoneal em camundongos Balb/c singeneicos para produzir ascite que contém esses anticorpos monoclonais. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas em frascos de cultivo de tecidos ou garrafas cilíndricas. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos na ascite pode ser realizada utilizando precipitação de sulfato de amônia, seguida por cromatografia de exclusão de gel. Alternativamente, pode-se empregar cromatografia de afinidade com base na ligação de anticorpos a proteína A ou proteína G.

EXEMPLO 14

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DESEJADA UTILIZANDO ANTICORPOS ESPECÍFICOS

A proteína desejada, em forma nativa ou recombinante, pode ser purificada através de uma série de métodos padrão na técnica de purificação de proteínas. Pró-polipeptídeo, polipeptídeo maduro ou formas de pré-polipeptídeo da proteína desejada podem ser purificados, por exemplo, através de cromatografia de imunoafinidade, utilizando anticorpos específicos para a

PI0403964

proteína desejada. De forma geral, uma coluna de imunoafinidade é construída através de acoplamento covalente do anticorpo que ligga especificamente a proteína desejada a uma resina cromatográfica ativada.

Imunoglobulinas policlonais são preparadas a partir de soros imunológicos através de precipitação com sulfato de amônia ou de purificação sobre Proteína A imobilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway NJ, Estados Unidos). De forma similar, são preparados anticorpos monoclonais a partir de fluido de ascite de camundongo, através de precipitação de sulfato de amônio ou cromatografia sobre Proteína A imobilizada. Imunoglobulina parcialmente purificada é ligada covalentemente a uma resina cromatográfica tal como SEPHAROSE® ativada por CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). O anticorpo é acoplado à resina, a resina é bloqueada e a resina derivada é lavada de acordo com as instruções do fabricante.

Essa coluna de imunoafinidade é utilizada na purificação da proteína desejada através da preparação de uma fração de células que a expressam em forma solúvel. Esta preparação é derivada da solubilização de toda a célula ou de uma fração subcelular obtida através de centrifugação diferencial pela adição de detergente ou outros métodos bem conhecidos na técnica. Alternativamente, proteína solúvel que contém uma seqüência de sinal pode ser segregada em quantidade útil no meio em que são cultivadas as células.

A preparação solubilizada que contém a proteína desejada passa sobre a coluna de imunoafinidade e a coluna é lavada sob condições que permitem a absorção preferencial da proteína desejada (por exemplo, tampões de alta resistência iônica na presença de detergente). Em seguida, a coluna é eluída sob condições que interrompem a ligação de anticorpo a proteína (por exemplo, tampão de baixo pH, tal como cerca de pH 2 a 3, ou alta concentração de um caotropo, tal como uréia ou íon de tiocianato) e a proteína

PI0403964

desejada é recolhida em seguida.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação líquida estável com baixa turbidez, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) anticorpo monoclonal anti-IgE, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, em uma quantidade de 150 mg/ml, em que o anticorpo anti-IgE ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende três CDRs de uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 e três CDRs de uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:4,

(b) arginina-HCl em uma quantidade de 200 mM;

(c) histidina em uma quantidade 20 mM; e

(d) polissorbato em uma quantidade de 0,01 a 0,1%,

em que a formulação possui adicionalmente pH 6,0.

2. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-IgE compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 e uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:4, ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo.

3. Formulação de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o polissorbato está em uma quantidade de 0,02%.

4. Artigo manufaturado, caracterizado pelo fato de que compreende um recipiente que inclui a formulação como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Artigo manufaturado de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o recipiente é uma seringa.

6. Artigo manufaturado de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a seringa é contida adicionalmente em um dispositivo de injeção.

7. Artigo manufaturado de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de injeção é um auto-injetor.

8. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de uma dis

função mediada por IgE em um paciente.

9. Formulação de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a disfunção mediada por IgE é selecionada a partir do grupo que consiste em:

(i) rinite alérgica, asma, asma alérgica, asma não alérgica, dermatite atópica e gastroenteropatia; ou

(ii) hipersensibilidade, aspergilose bronquiopulmonar alérgica, doenças parasíticas, cistite intersticial, síndrome de hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma de IgE e reação de enxerto contra hospedeiro.

10. Formulação de acordo com a reivindicação 9(ii), caracterizada pelo fato de que a disfunção de hipersensibilidade é selecionada a partir do grupo que consiste em anafilaxia, urticária e alergia alimentar.

11. Formulação de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a alergia alimentar resulta da exposição a legumes, e em que, opcionalmente, o legume é amendoim.

12. Formulação de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a formulação é usada em combinação com um anti-histamínico, um broncodilatador, um glicocorticoide, ou um NSAID.

P10403964

147

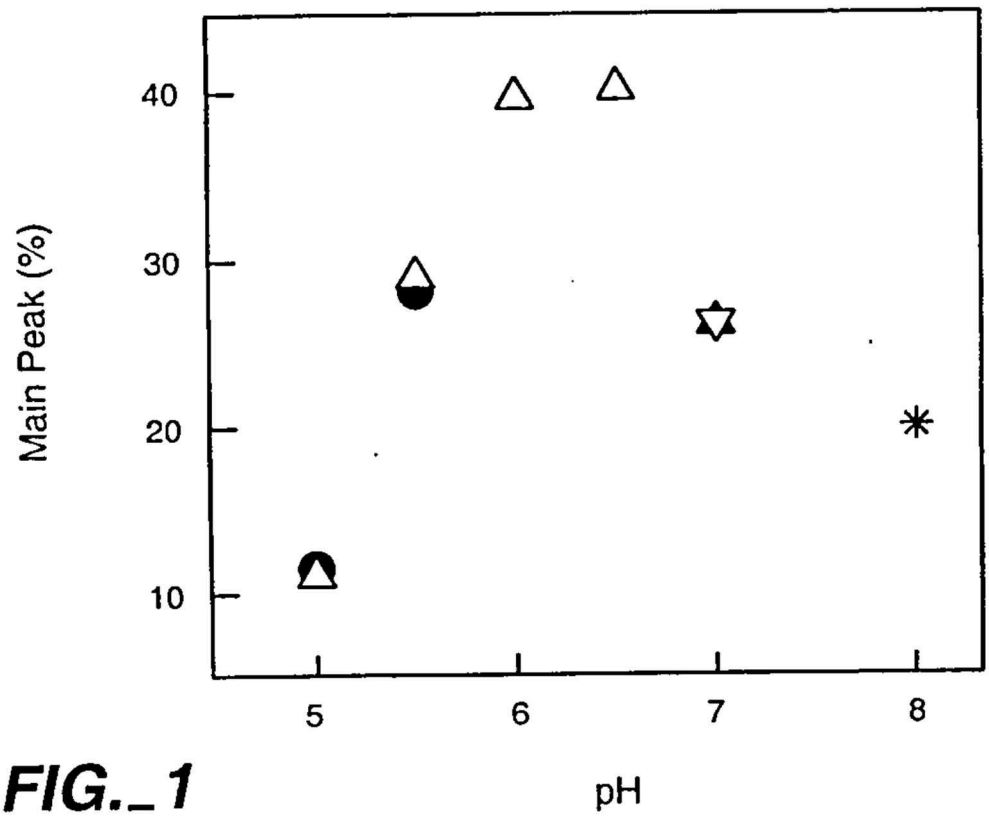


FIG._1

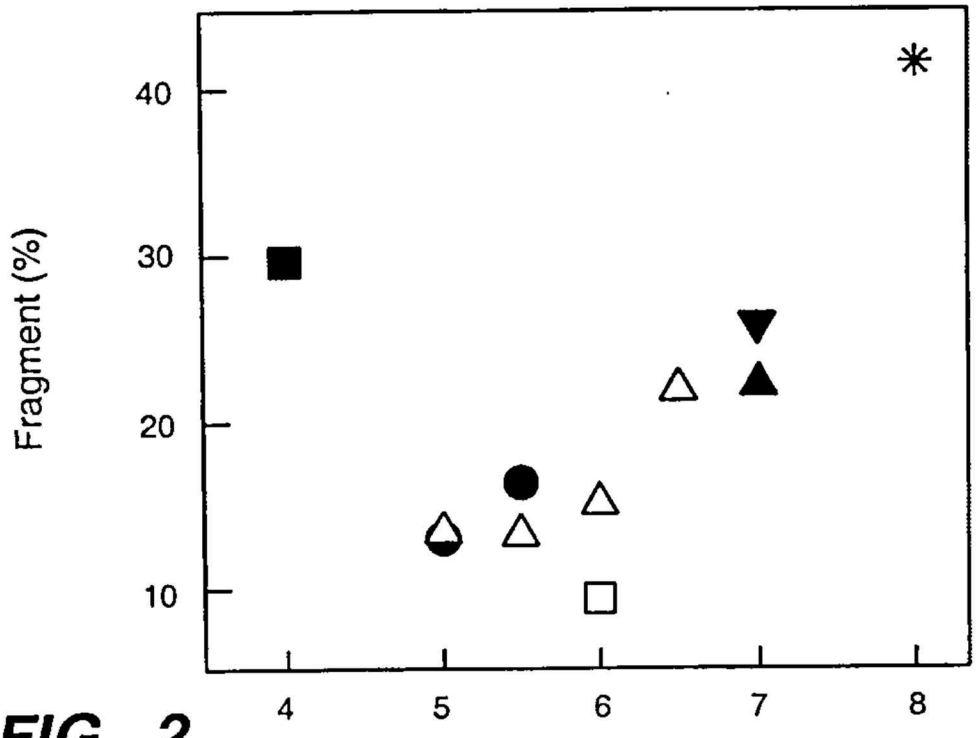


FIG._2

PID40964

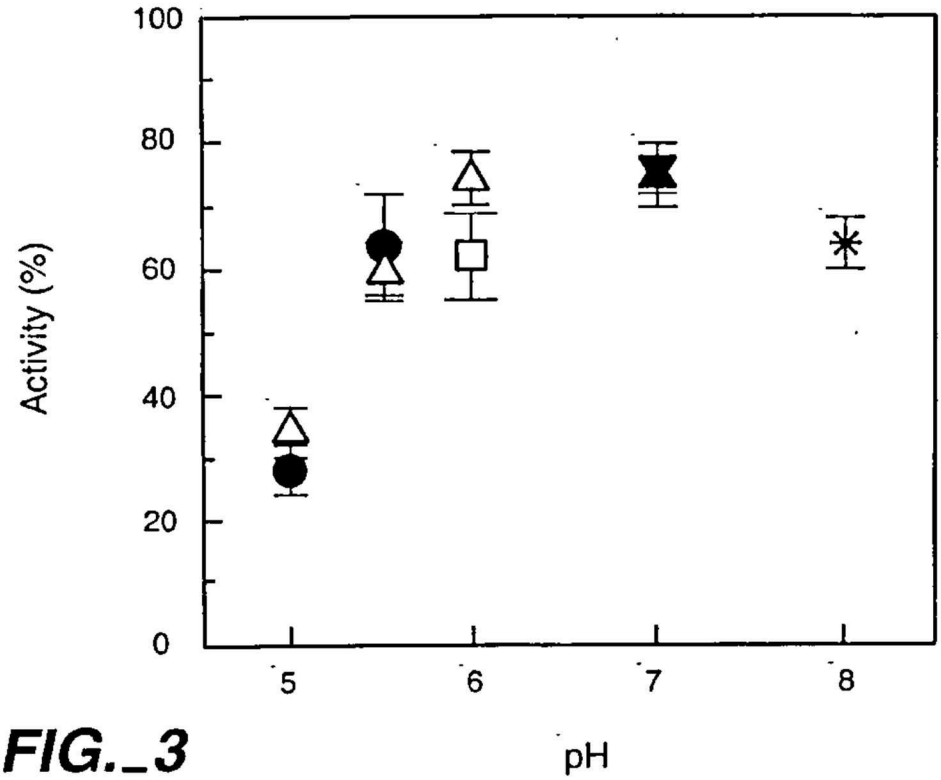


FIG._3

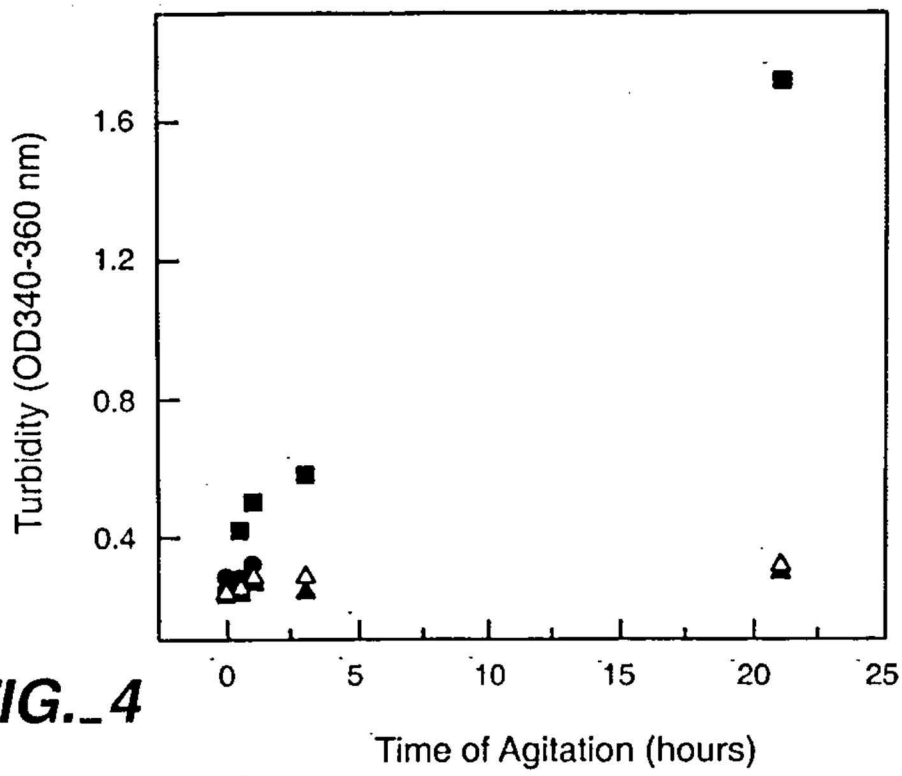


FIG._4

PID40396H

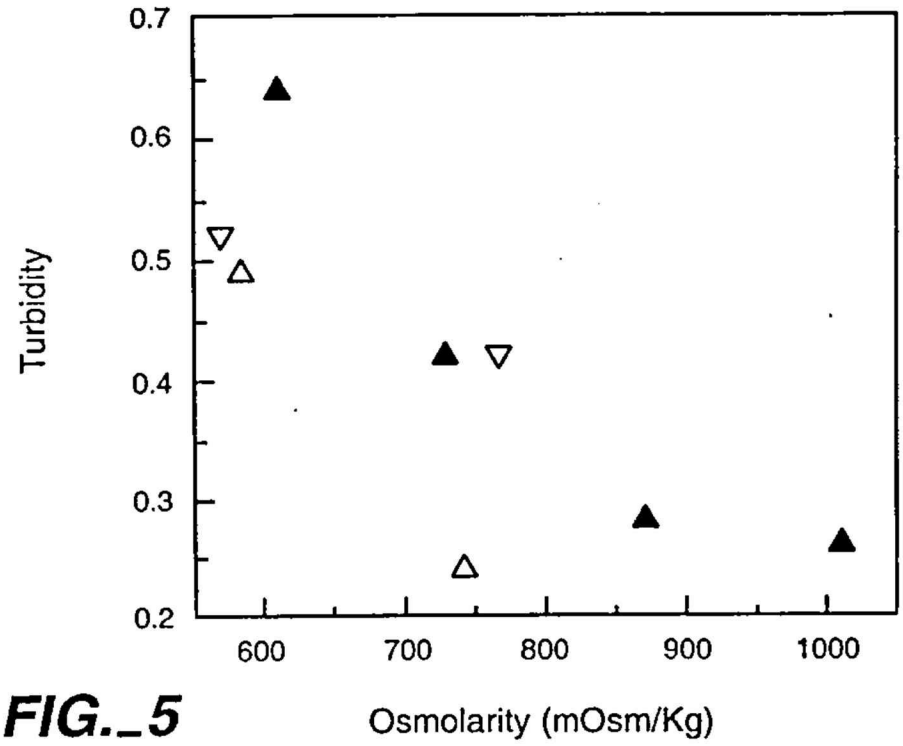


FIG._5

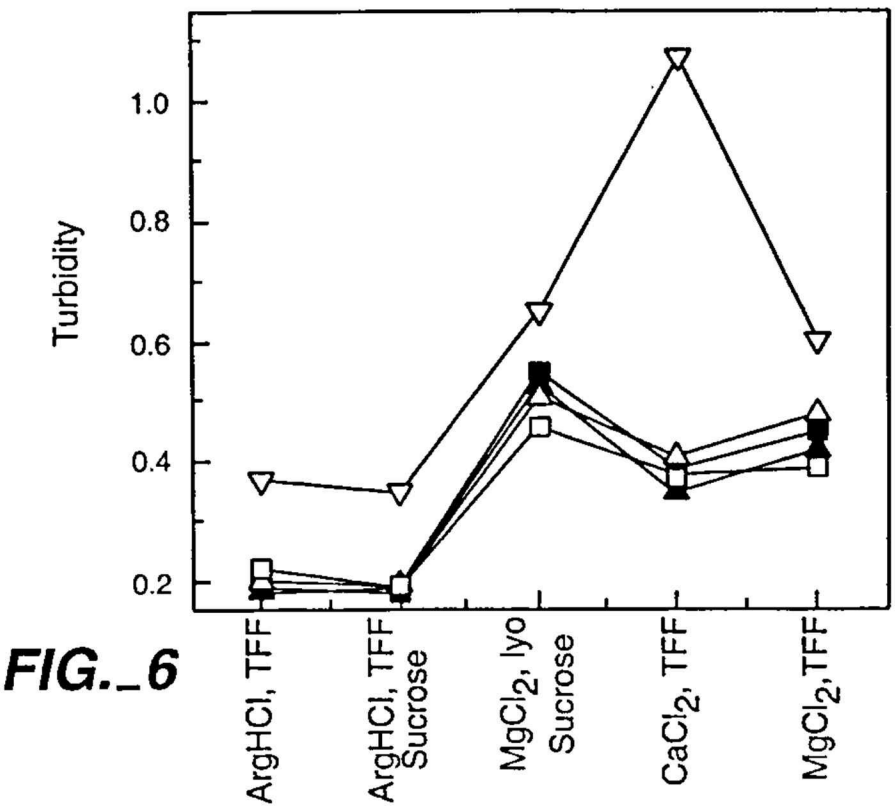


FIG._6

PIOH039864

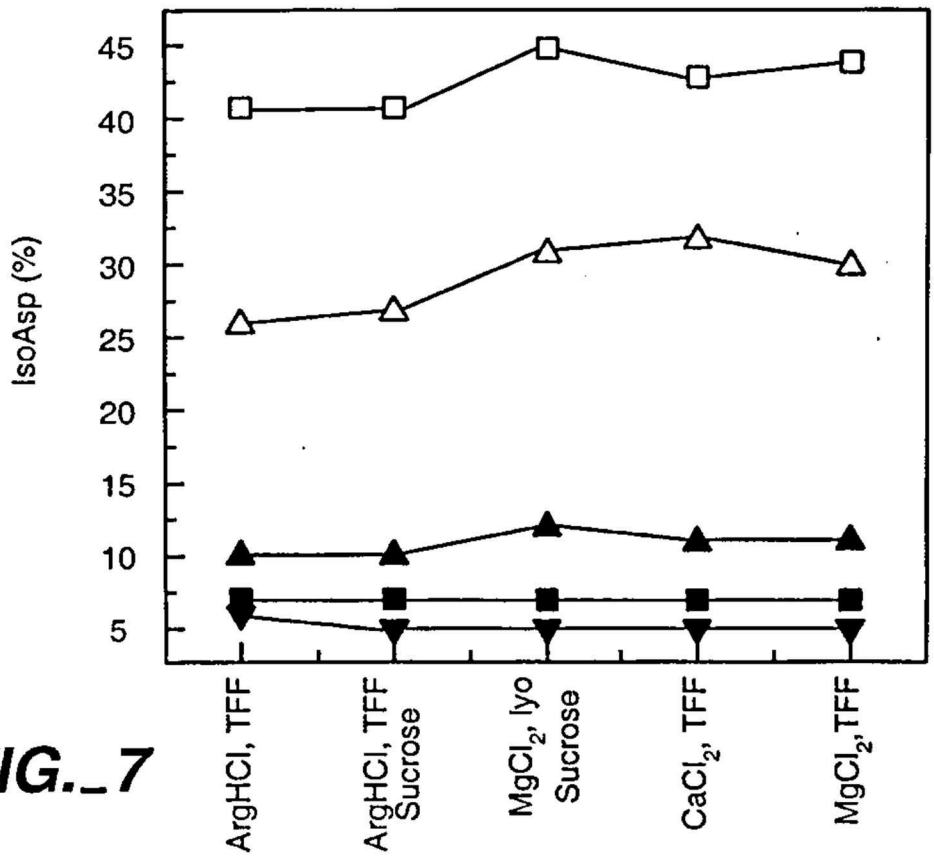


FIG._7

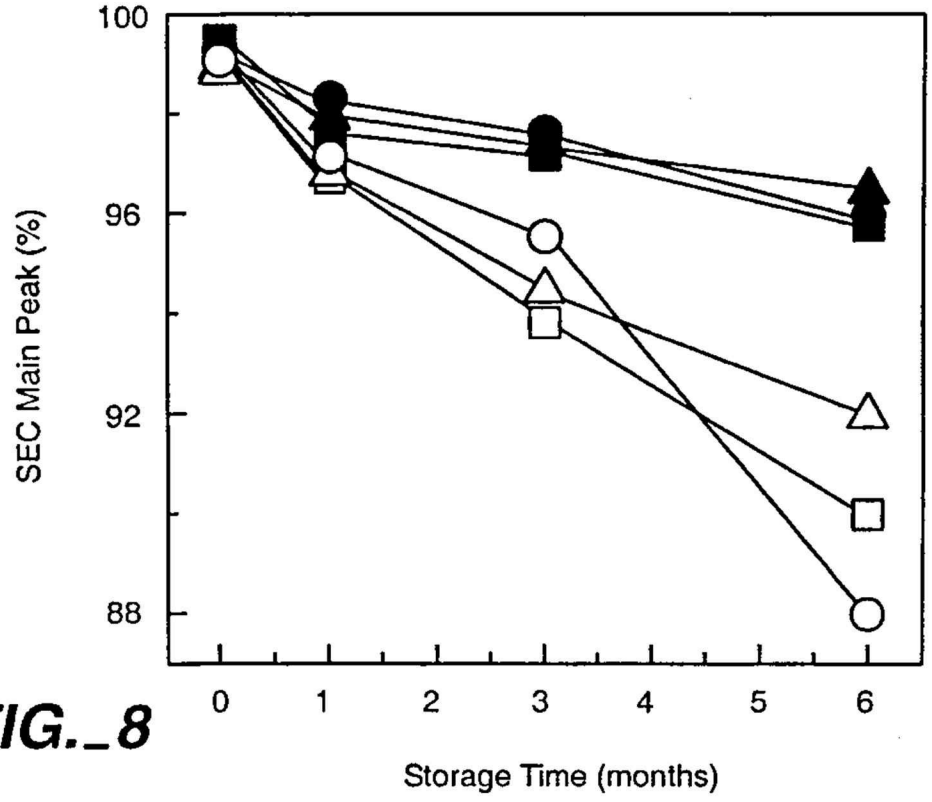


FIG._8

PD04.0364

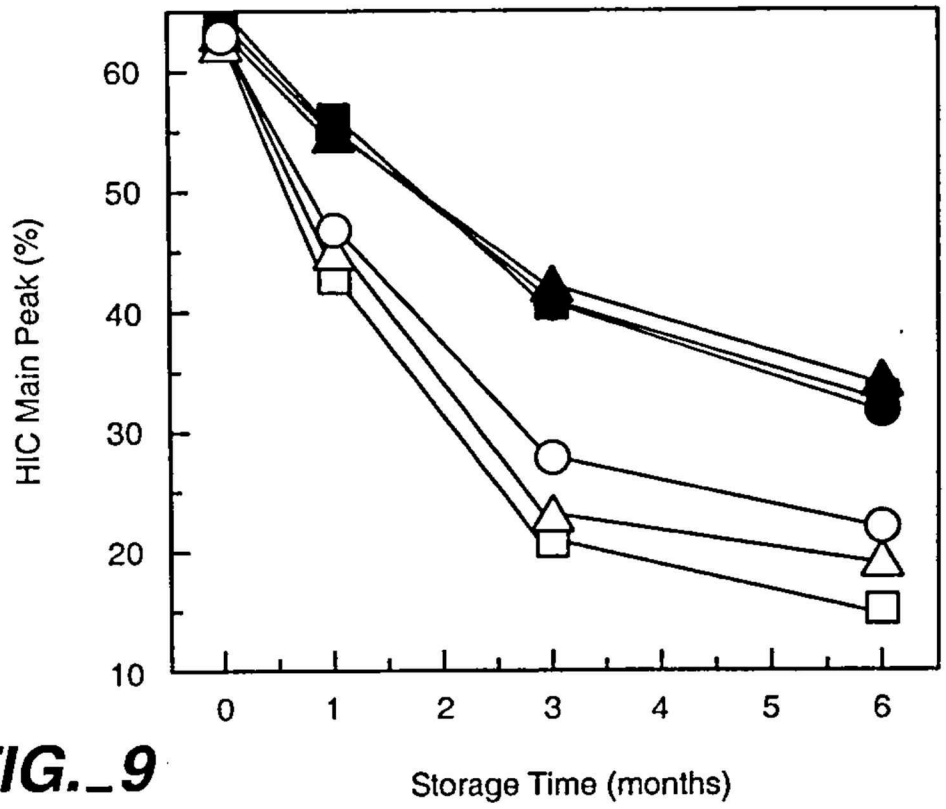


FIG._9

Anti-IgE Antibodies: Light Chain (V_L and C_L Domains)

```
                10        20        30        40        50        60        70        80
E25     DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITC[RASQSVD YDGDSYMN]WY QQKPGKAPKL LIY[AASYLES] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS
E26     DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITC[RASKPVD GEGDSYLN]WY QQKPGKAPKL LIY[AASYLES] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS
Hu-901  DIQLTQSPGT LSLSPGERAT LSC RASQSIG TNIH---- WY QQKPGQAPRL LIK YASESIS GIPSRFSGSG SGTDFTLTIS

                90        100       110     CL starts
E25     SLQPEDFATY YC[QQSHEDPY T]FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
E26     SLQPEDFATY YC[QQSHEDPY T]FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
Hu-901  RLEPEDFAMY YC QQSDSWPT T FGQGTKVEI KRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD

E25       SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
E26       SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Hu-901    SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

FIG._10A

Anti-IgE Antibodies: Heavy Chain (V_H and C_H Domains)

```
                10        20        30        40        50 a      60        70        80        90
E25     EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED
E26     EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED
Hu-901  QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTF- S MYWLEW VRQ APGHGLEWVG EISPGTFTTNY NEKFKA RATF TADTSTNTAY MELSSLRSED

                100       110ab       120 CH starts
E25     TAVYYCAR[GS HYFGHWHFAV]  WGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
E26     TAVYYCAR[GS HYFGHWHFAV]  WGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
Hu-901  TAVYYCAR FS HFSGSNYDYFDY WGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

E25     VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
E26     VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
Hu-901  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

E25     VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
E26     VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
Hu-901  VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

E25     SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
E26     SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Hu-901  SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

FIG._10B