



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0717882-4 A2



* B R P I 0 7 1 7 8 8 2 4 2 *

(22) Data de Depósito: 30/10/2007
(43) Data da Publicação: 29/10/2013
(RPI 2234)

(51) *Int.Cl.*:
C07H 21/02
C07K 16/00
C12N 5/02

(54) Título: MÉTODOS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO HUMANIZADO, MURINO HUMANIZADO OU ANTICORPO PARENTAL; OU UM FRAGMENTO, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A EPITOPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DOS MESMOS EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA PELA REENGENHARIA DE SEQUÊNCIA, ANTI-CORPO E ANTICORPO VARIANTE OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A EPITOPO DO MESMO E ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 31/10/2006 US 60/855,361

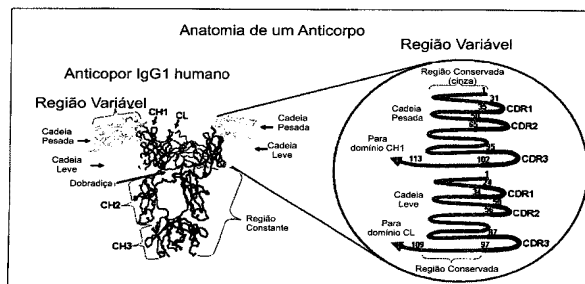
(73) Titular(es): Immunogem, INC.

(72) Inventor(es): Daniel Tavares, Xiao-Mai Zhou

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007082994 de 30/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/073598de 19/06/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO HUMANIZADO, MURINO HUMANIZADO OU ANTICORPO PARENTAL; OU UM FRAGMENTO, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A EPITOPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DOS MESMOS EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA PELA RE-ENGENHARIA DE SEQUÊNCIA, ANTICORPO E ANTICORPO VARIANTE OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A EPITOPO DO MESMO E ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO".

Este pedido reivindica prioridade sobre Pedido provisório U.S. Nº 60/855.361, depositado em 31 de outubro de 2006, a descrição completa do qual é incorporada neste pedido por referência.

CAMPO DE INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos de produção de anticorpos melhorados. Mais particularmente, a métodos em que os anticorpos são reprojitados tal que os anticorpos re-engeheirados sejam produzidos com maior rendimento em células hospedeiras em comparação ao anticorpo parental do anticorpo reprojitado.

ANTECEDENTES

Anticorpos monoclonais têm uma ampla variedade de usos incluindo diagnóstico in vitro, reagentes de laboratório, e terapêuticos. Atualmente, há pelo menos 200 anticorpos ou fragmentos de anticorpo passando testes clínicos (Morrow, K. J., Jr., Monoclonal antibody production techniques. Gen. Eng. News, 2002, 20(14): 21).

Expressão em alto nível de anticorpos em células CHO requer eficiência máxima da transcrição através da tradução e secreção. Plasmídeos de expressão de mamíferos são principalmente projetados para alcançar altos níveis de RNAm através do uso de ativadores virais potentes como o gene ativador precoce mediado hCMV e a sequência promotora em conjunto com sinais de poliadenilação estabilizada por transcrito como os sítios poli A SV40.

Construtos sintéticos de cDNA podem ser projetados para aumentar ainda os níveis de RNAm pela eliminação dos sítios crípticos de spli-

ce e outros elementos cis potencialmente prejudiciais dentro da sequência de codificação de anticorpo. Além disso, os construtos sintéticos podem ativar o maquinário de tradução gênica através do uso máximo do códon e pela minimização das energias de estrutura secundárias do RNAm (Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, Seyfzadeh M. Optimization of codon pair use within the (GGGGS)₃ linker sequence results in enhanced protein expression. Mol.

5

Immunol. 2004 Jan; 40(10):717-22). Entretanto, até com tais sistemas de expressão maximizados, níveis de expressão em células de mamíferos podem variar significativamente entre anticorpos diferentes. Análise de etapas celulares diferentes que são necessárias para a síntese de moléculas de anticorpo a partir da expressão de plasmídeos, leva à noção de que as propriedades da região variável de um anticorpo podem afetar os níveis de expressão de um dado anticorpo. Entretanto, pouco é conhecido sobre as características da sequência e a estrutura de regiões variáveis que podem afetar a expressão gênica independente de eficiência de tradução ou transcrição.

Muitos anticorpos derivados de subclasses específicas de genes de região variáveis são biofisicamente predispostos à baixa estabilidade que pode levar à baixa expressão gênica. Regiões variáveis de cadeia leve e pesada humanas podem ser classificadas em subgrupos com graus variados da estabilidade estrutural baseada em uma análise de uma biblioteca de fago scFv humana ((Ewert S, Honegger A, Pluckthun A. Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry*. 2003 Feb 18; 42(6): 1517-28). Um anticorpo ou fragmento pertencente a um subgrupo com membros de baixa estabilidade podem ter uma propensão a agregar-se e pode ser difícil de expressar devido ao enovelamento ou montagem ineficientes.

Além disso, resíduos que desempenham papéis críticos em processos como enovelamento e secreção muitas vezes são altamente conservados em sequências de linhagem germinativa, mas podem ser alterados durante a geração do repertório de anticorpo primário e maturação de afinidade através de mutações somáticas. Isto pode levar a anticorpos que têm baixa estabilidade e baixa expressão. Uma modificação de resíduo único pode alterar dramaticamente a ligação chaperona ou montagem da cadeia leve/cadeia pesada e resultar em um aumento na cadeia pesada não-pareada intracelular que é conseqüentemente degradada (Dul JL, Argon Y. A single amino acid substitution in the variable region of the light chain specifically blocks immunoglobulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Oct;

87(20):8135-9; Wiens GD, Lekkerkerker A, Veltman I, Rittenberg MB. Mutation of a single conserved residue in VH complementarity-determining region 2 results in a severe Ig secretion defect. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):2179-86). Outras mutações desestabilizantes incluem introdução de resíduos hidrofílicos inseridos ou resíduos hidrofóbicos de superfície. Resíduos de empacotamento principais invariantes como a cadeia pesada Glu6/Gln6 são também sensíveis a modificações de resíduos em posições vizinhas como H7 e H10 (Honegger A, Plückthun A. The influence of the buried glutamine or glutamate residue in position 6 on the structure of immunoglobulin variable domains. *J Mol Biol.* 2001 Jun 8; 309(3):687-99). Enquanto uma mutação somática não atravessa um limiar estrutural crítico, muitas sequências indesejáveis biofísicamente podem ser encontradas em anticorpos de ocorrência natural.

O potencial de estabilidade e expressão de muitos anticorpos pode ser aumentado com uma abordagem de re-engenharia da sequência racional. Uma das abordagens mais simples para re-engenharia de um anticorpo é utilizar a informação presente em bases de dados de milhares de sequências de anticorpos (vide, por exemplo, Johnson G, Wu TT. *Kabat Database and its applications: future directions.* *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1; 29(1):205-6.). Análise cuidadosa pode identificar resíduos potencialmente problemáticos. Por exemplo, resíduos individuais que são raramente encontrados em uma dada posição podem ser alterados para combinar um resíduo consenso a esta posição para melhorar a estabilidade (Steipe B, Schiller B, Plückthun A, Steinbacher S. Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J Mol Biol.* 1994 Jul 15; 240(3): 188-92.) e mesmo expressão equilibrada em linhagens celulares de mamíferos (Whitcomb EA, Martin TM, Rittenberg MB. Restoration of Ig secretion: mutation of germline-encoded residues in T15L chains leads to secretion of free light chains and assembled antibody complexes bearing secretion-impaired heavy chains. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4): 1903-9). A identificação e reversão de resíduos biofísicamente ofensivos, tais como resíduos de superfície hidrofóbicos também podem levar à expressão melhorada ((Nieba L, Honegger A,

Krebber C, Pluckthun A. Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng.* 1997 Apr; 10(4):435-44). A maioria dos dados atualmente disponíveis para apoiar o

5 redesenho racional de anticorpos biofisicamente estáveis foi gerada com fragmentos de anticorpo em sistemas de exposição em fago expresso em bactérias (Ewert S, Honegger A, Plückthun A. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods.* 2004 Oct; 10 34(2): 184- 99. Review).

Humanização por técnicas de enxerto de CDR pode fixar ou evitar estes problemas de estabilidade simplesmente pela escolha de uma estrutura de região variável de doador humano de um dos subgrupos de linhagem germinativa mais estáveis sempre que possível (Ewert e outros, 2004,

15 supra). WO 2004/065417 fornece uma melhora adicional para produção de tais fragmentos de ligação a anticorpos e/ou antígenos em culturas celulares de mamíferos em rendimentos mais altos pela comparação da sequência de aminoácidos da região Hipervariável 1 (HVRI) e/ou região Hipervariável 2 (HVR2) do domínio variável de um anticorpo para uma sequência correspondente de aminoácidos HVRI e/ou HVR2 de cada uma das do subgrupo

20 de sequências de aminoácido consenso de domínio variável humano e selecionando o subgrupo de sequência consenso que tem a maior identidade de sequência com sequência de aminoácidos HVRI e/ou HVR2 do domínio variável. Em WO2004/065417, a sequência consenso é derivada de anticorpos

25 com mais idêntico HVRI e/ou HVR2 e é aplicada a anticorpos enxertados com CDR onde todas as sequências estruturais são sequências humanas completas.

Outros métodos de humanização, tais como os métodos de recobrir a superfície de anticorpos de roedor (Patente U.S. No. 5.639.641; Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad*

30

Sci U S A. 1994 Feb 1 ; 91(3):969-73; Pedersen JT, Henry AH, Searle SJ, Guild BC, Roguska M, Rees AR. Comparison of surface accessible residues in human and murine immunoglobulin Fv domains. Implication for humanization of murine antibodies. J Mol Biol. 1994 Jan 21; 235(3):959-73), de revestimento de anticorpos (Patente U.S. No. 6.797.492; Padlan, E.A. 1991, Mol. Immunolgy 28:489-498), e de imunização de anticorpos (publicação N. WO98/52976) mantêm o núcleo hidrofóbico da região variável murino. Como uma consequência, tais anticorpos humanizados com estruturas de núcleo murino na região variável derivada de uma linhagem germinativa murino com propriedades biofísicas inferiores herdarão provavelmente estas propriedades. Há, por isso, uma necessidade de métodos que possam melhorar as propriedades biofísicas de tais anticorpos humanizados. Estes métodos renderiam maior expressão de anticorpos de células de mamíferos com superfície recoberta.

15 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece em geral um método para melhorar as propriedades biofísicas de um anticorpo ("anticorpo parental" a seguir) que resulta na produção aumentada de anticorpo. O método identifica um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso na estrutura da região variável do anticorpo parental e preferencialmente os substitui com um ou mais resíduos consenso. Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

Os resíduos consenso são identificados pelo alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura de região variável de anticorpo a partir de anticorpos das mesmas espécies (por exemplo, murino) ou através das espécies do mesmo gênero (por exemplo, mus e rattus) ou de todo os gêneros ou outra classificação taxonômica de acordo com suas relações naturais presumidas como aquelas das quais o anticorpo do qual o parental foi derivado pertence.

30 Mais particularmente, a presente invenção engloba um método para aumento da produção de um anticorpo parental ou um fragmento de ligação a epitopo dos mesmos em uma célula hospedeira pela re-engenharia

de sequência. A re-engenharia de sequência compreende:

a) alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura de região variável de anticorpo a partir de anticorpos das mesmas espécies (por exemplo, murino) ou através das espécies do mesmo gênero (por exemplo, mus e rattus) ou de todos os gêneros ou outra classificação taxonômica de acordo com as suas relações naturais presumidas como aquelas das quais o anticorpo do qual o parental foi derivado pertence, em que tal alinhamento identifica resíduos de aminoácido mais frequentemente encontrados (resíduos consenso) em cada posição na estrutura;

b) comparação dos resíduos consenso com os resíduos correspondentes na sequência de estrutura de região variável de anticorpo parental;

c) identificação no anticorpo parental de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso na sequência de estrutura de região variável; e

d) substituição no anticorpo parental ou fragmento do mesmo de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso com o resíduo consenso na posição equivalente para produzir um anticorpo variante, em que o anticorpo variante é produzido na célula hospedeira em um rendimento maior quando comparado com o anticorpo parental.

Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos por um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

A presente invenção também fornece em geral um método para melhorar as propriedades biofísicas de um anticorpo humanizado que resulta na produção aumentada de anticorpo. O método identifica um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso no núcleo da estrutura da região variável do anticorpo humanizado e os substitui com um ou mais resíduos consenso. Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas. Os resíduos consenso são identificados pelo alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura de região variável de anticorpo a partir de anticorpos das mesmas espécies ou através das espécies (por exemplo, murino) do mesmo gênero (por exemplo, mus e rattus) ou de todos os gêneros ou outra classifica-

ção taxonômica de acordo com as suas relações naturais presumidas como aquelas das quais o anticorpo do qual o parental foi derivado pertence.

Dessa maneira, a presente invenção engloba um método para aumentar a produção de um anticorpo humanizado ou um fragmento de ligação a epitopo do mesmo em uma célula hospedeira pela re-engenharia da sequência. A engenharia de sequência compreende:

a) alinhamento de uma coleção de sequências de estruturas de região variável de anticorpo a partir de anticorpos das mesmas espécies (por exemplo, murino) ou através das espécies do mesmo gênero (por exemplo, mus e rattus) ou de todo o gênero ou outra classificação taxonômica de acordo com as suas relações naturais presumidas como aquelas das quais o anticorpo do qual o parental foi derivado pertence, em que tal alinhamento identifica resíduos de aminoácido mais frequentemente encontrados (resíduos consenso) em cada posição na estrutura;

b) comparação dos resíduos consenso com os resíduos correspondentes na sequência de estrutura de região variável de anticorpo humanizado;

c) identificação no anticorpo humanizado de um ou mais resíduos não-consenso na sequência da estrutura de região variável; e

d) substituição no anticorpo humanizado ou fragmento do mesmo no dito um ou mais resíduos não-consenso com o resíduo consenso na posição equivalente para produzir um anticorpo variante, em que o anticorpo variante é produzido em uma célula com um rendimento maior quando comparado ao anticorpo humanizado.

Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para melhorar as propriedades biofísicas de um anticorpo murino humanizado que resulta na produção aumentada de anticorpo. O método identifica um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso na estrutura de região variável do anticorpo humanizado e os substitui com um ou mais resíduos consenso. Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um

resíduo não-consenso por considerações biofísicas. Os resíduos consenso são identificados pelo alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura de região variável de anticorpo a partir de anticorpos murinos.

5 Mais particularmente, a presente invenção engloba um método para aumento da produção de um anticorpo murino humanizado ou um fragmento de ligação a epitopo do mesmo em uma célula hospedeira pela re-engenharia de sequência. A re-engenharia de sequência compreende:

10 a) alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura de região variável de anticorpo murino, em que tal alinhamento identifica resíduos de aminoácido mais frequentemente encontrados (resíduos consenso) em cada posição na estrutura;

b) comparação dos resíduos consenso com os resíduos correspondentes na sequência de estrutura da região variável do anticorpo humanizado;

15 c) identificação no anticorpo humanizado de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso na sequência de estrutura da região variável; e

20 d) substituição na sequência de estrutura da região variável do anticorpo humanizado ou dito fragmento do mesmo de um ou mais resíduos não-consenso com o resíduo consenso na posição equivalente para produzir um anticorpo variante, em que o anticorpo variante é produzido em uma célula com rendimento maior quando comparado ao anticorpo humanizado.

Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

25 A invenção também engloba ácidos nucleicos isolados que codificam os anticorpos variantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

30 A figura 1 mostra uma representação esquemática de um anticorpo IgG e as regiões variáveis de uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Um desenho da representação das regiões variáveis de cadeia pesada e leve é mostrada à direita com os resíduos de estrutura em cinza e o do CDR em preto. Os números de sequência de resíduo de anticorpo Kabat são da-

dos para região variável final bem como os limites de cada CDR.

A figura 2 mostra baixa produção de huC242 por células 293T algumas horas após transfecção transiente com um plasmídeo contendo os genes huC242. Plasmídeos para anticorpos humanizados A, B7 e huC242 foram normalizados na concentração e introduzidos em células 293T em paralelo a 2µg/ml. Os anticorpos secretados foram coletados no meio de cultura em 14 horas, 22 horas e 48 horas após transfecção. Concentrações de anticorpo foram determinadas usando um ELISA anti-huIgG1.

A figura 3 mostra níveis de RNAm huC242 HC e LC em células 293T transfectadas transitoriamente. HuC242 e outros anticorpos com superfície recoberta A, B, C, D, E, F, foram introduzidos em células 293T em paralelo. RNAm total foi isolado a partir de cada amostra de célula transfectada 72 horas após transfecção e amostras foram posteriormente reversamente transcritas em cDNA.

A figura 4 mostra um gel com bandas de anticorpo intacto montado, H2L2 marcado, e cadeia pesada, H marcada, a partir de células CHO que produzem huC242 ou Ac A recoberto na superfície. Expressão e montagem de Ac. A e clone 1 e clone 2 de huC242 foram comparados. As linhagens celulares CHO para AC. A e os dois clones C242 foram cultivados em paralelo e as células lisadas. Lisados celulares totais foram submetidos à purificação em proteína A. IgGs isoladas foram separadas em um gel não-desnaturante e corados com Coomassie Blue.

A figura 5 A mostra a sequência de região variável da cadeia pesada do anticorpo huC242 (SEQ ID NO:1) alinhada com a respectiva sequência consenso de anticorpos murinos no banco de dados Kabat (SEQ ID NO:3). Os CDR'S são sublinhados e marcados em negrito. Os resíduos que se diferenciam entre as sequências são destacados com fundos cinza e os resíduos preferenciais discutidos detalhadamente neste pedido são destacados com fundos pretos. Os resíduos superficiais são marcados com um asterisco "*" abaixo.

A figura 5 B mostra a sequência de região variável da cadeia leve do anticorpo huC242 (SEQ ID NO:2) alinhada com a respectiva se-

quência consenso de anticorpos murinos no banco de dados Kabat (SEQ ID NO:4). Os CDR'S são sublinhados e marcados em negrito. Os resíduos que se diferenciam entre as sequências são destacados com fundos cinza e os resíduos preferenciais discutidos detalhadamente neste pedido são destacados com fundos pretos. Os resíduos superficiais são marcados com um asterisco "*" abaixo.

A figura 5 C mostra o alinhamento da sequência de região variável de cadeia leve de anticorpo huC242 (SEQ ID NO:5) alinhada com a respectiva sequência consenso de quatro anticorpos murinos humanizados com superfície recoberta da ImmunoGen (huMy96 LC, SEQ ID NO:6; rB4 LC, SEQ ID NO:7; huEM 164 LC, SEQ ID NO:8; huN901 LC, SEQ ID NO:9; Consensus, SEQ ID NO: K)), que mostra que em quatro anticorpos humanizados o aminoácido R é o resíduo de aminoácido conservado para o Q não-consenso encontrado no huC242. No banco de dados murino R é substituído com K, que é o resíduo de aminoácido mais conservado. Neste caso, K é substituível por R devido a propriedades semelhantes dos dois aminoácidos. No entanto, a substituição de Q por K é englobada por estar dentro do escopo desta invenção. O alinhamento é baseado em Kabat.

A figura 6 mostra o aumento moderado na produção de IgG causada por uma substituição única de aminoácido na estrutura de HC ou LC do huC242. A produtividade de variantes huC242 com substituições únicas na estrutura de aminoácidos é comparada com aquela do huC242 parental e anticorpo B. Quantidades iguais de plasmídeos foram transfectadas em células 293T. Após 72 horas, os níveis de IgG secretados foram determinados com um ELISA. A ligação do variante huC242 a células Colo 205 que expressam antígeno foi medida por FACS.

A figura 7 mostra o aumento significativo na produção de IgG pela combinação de duas ou três variações HC e LC do huC242 em experimentos de expressão transiente em 293T. A produtividade de huC242 original é estabelecida como 1,0. IgGs secretados foram coletados a partir do meio de cultura 72 horas após transfecção.

A figura 8 mostra que os níveis de RNAm das variantes de HC e

LC de huC242 permanecem inalterados. Níveis de RNAm de huC242 variante específico foram determinados por qPCR, e normalizada pelo RNAm de neo.

5 A figura 9 mostra o acúmulo aumentado de LC intracelular como resultado de substituições de resíduo de estrutura HC por eletroforese de lisado celular total em um gel desnaturante. Células 293T foram lisadas 72 horas após transfecção. HC e LC foram detectadas com anticorpos anti-hulgI e anti-huK, respectivamente.

10 As figuras 10(a) e 10(b) mostram que as variações huC242 levam a síntese aumentada de HC e LC e montagem aumentada do anticorpo inteiro (H2L2) em células.

15 A figura 10(a): células 293T foram lisadas 72 horas após transfecção. Os lisados foram separados em um gel e transferidos para uma membrana, que foi marcada para HC e LC de IgG montada e não-montada (eletroforese foi sob condições não-desnaturantes). O blot foi reaproveitado e remarcado com anticorpo antitubulina para mostrar os níveis de amostra carregada.

20 A figura 10(b): IgGs foram isoladas a partir de lisados celulares preparados como descrito na figura 10(a) usando contas de afinidade em proteína A. As amostras isoladas foram então submetidas a eletroforese em um gel não-desnaturante, que foi posteriormente corado com Coomassie Blue.

25 A figura 11(a) mostra uma análise por FACS da ligação de huC242 e variantes de huC242 a células Colo 205. Ac B é um anticorpo controle não ligante.

A figura 11(b) mostra uma análise por FACS da ligação de conjugados de DM4 de huC242 e variantes do huC242 a células Colo 205. Ab B é um anticorpo de controle não-ligante.

30 A figura 11(c) mostra os resultados da ligação de competição de anticorpos huC242 parental e variante huC242 com huC242 parental marcado com FITC em células Colo 205 usando análise de FACS. O anticorpo B serve como um controle não-ligante, não-competidor.

A figura 12 mostra aminoácido huC242 e as sequências de ácidos nucleicos da cadeia pesada (Painel A; SEQ ID NOs: 11 e 12) e a cadeia leve (Painel B; SEQ ID NOs: 13 e 14). Também mostra, no Painel C, a sequência de domínio variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 15) e a sequência de domínio variável de cadeia leve (SEQ ID NO: 16) do huC242 que representa o códon(s) que codifica as modificações de aminoácidos identificadas em huC242.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Enquanto a invenção é descrita com referência a anticorpos murinos humanizados, aqueles versados na técnica ordinária entenderão que o método de re-engenharia pode ser aplicado a qualquer anticorpo para o qual há uma base de dados suficientemente grande a partir da qual derivar uma sequência consenso da região(ões) variável de cadeia leve e/ou de cadeia pesada.

Um modo padrão de geração de anticorpos monoclonais para antígenos humanos é imunizar outras espécies de animais com o antígeno, gerar hibridomas com célula B imune do animal, e selecionar os clones de hibridoma que secretam anticorpos que se ligam ao antígeno humano. Mais comumente, os animais usados são camundongos ou ratos, dessa maneira os anticorpos gerados são anticorpos murinos. Anticorpos monoclonais para antígenos humanos são usados em humanos com objetivos diagnósticos ou para tratamento de várias doenças, tais como câncer, doenças autoimunes, inflamação, e infecções. Entretanto, o uso de anticorpos monoclonais murinos em humanos é limitado, porque os anticorpos são reconhecidos como proteínas estranhas e provocam uma resposta imune, muitas vezes chamada resposta HAMA (resposta de anticorpo de anti-camundongo humana). Para prevenir uma resposta HAMA, métodos foram desenvolvidos para a humanização de anticorpos murinos. Todos os métodos substituem o domínio da região murino constante (para a estrutura de domínio de um IgG vide Figura 1) com um domínio de região constante humano, mas diferem na estratégia de humanização do domínio de região variável do anticorpo. Método de enxerto CDR transfere os seis domínios CDR da região variável murino a

uma região variável humana homóloga pela substituição dos domínios CDR humanos, dessa maneira, as regiões de estrutura de domínio variável murino são inteiramente substituídas por regiões de estrutura humana homóloga. Outros métodos de humanização, tais como os métodos de recobrir a superfície de anticorpos de roedor (Patente U.S. No. 5.639.641; Roguska e outros 5 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:969-973, supra; Pedersen e outros 1994, J. Mol. Biol. 235:969-973, supra), de revestimento de anticorpos (Patente U.S. No. 6.797.492; Padlan. E. A. 1991, Mol. Immunolgy 28:489-498, supra), e de imunização de anticorpos (publicação internacional N. 10 WO98/52976) mantêm o núcleo hidrofóbico da região de estrutura de domínio variável murino e modifica somente a superfície exposta à resíduos na região de estrutura com resíduos humanos. Por exemplo, um anticorpo humanizado usando a técnica de recobrimento da superfície contém resíduos humanos em todas as posições da estrutura da região variável acessíveis a 15 solventes enquanto conserva os resíduos murinos nos CDR's e imerge posições da estrutura da região variável. Estes anticorpos humanizados conservam a afinidade de ligação do anticorpo murino original que muitas vezes é perdida quando o núcleo hidrofóbico é substituído em outros métodos de humanização, tais como enxerto de CDR.

20 Anticorpos humanizados são tipicamente produzidos tendo seus genes expressos em uma célula hospedeira de mamífero, tal como células CHO (ovário de hamster chinês) ou células T293 (uma linhagem celular de rim humano). Observou-se que diferentes anticorpos humanizados preparados pela tecnologia de recobrimento de superfície foram produzidos em 25 quantidades diferentes nas mesmas células hospedeiras de mamíferos (Figura 2), embora quantidades similares de RNAm para os anticorpos foram produzidas (Figura 3). Concluiu-se que a sequência primária de aminoácidos das regiões variáveis afetou a produção dos anticorpos. Dessa maneira, desenvolveu-se um método para melhorar a produtividade em células hospedeiras de mamíferos de anticorpos monoclonais humanizados que têm um 30 núcleo de aminoácidos murinos inseridos nas estruturas de região de domínio variável.

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

	MAb	anticorpo monoclonal
	CH	região constante (domínio) da cadeia pesada
	CH1, CH2, CH3	regiões constantes 1, 2, & 3 da cadeia pesada
5	CL	região constante de cadeia leve
	VH	região variável (domínio) da cadeia pesada
	VL	região variável (domínio) da cadeia leve
	CDR	região de determinação de complementariedade
10	CDRL1, CDRL2, CDRL3	regiões de determinação de complementariedade de 1, 2, & 3 da cadeia leve
	CDRH1, CDRH2, CDRH3	regiões de determinação de complementariedade 1, 2, & 3 da cadeia pesada
	FR	região de estrutura (domínio) de domínio variável
15	FRL1, FRL2, FRL3, FRL4	regiões de estrutura 1, 2, 3, & 4 do domínio variável da cadeia leve
	FRH1, FRH2, FRH3, FRH4	regiões de estrutura 1, 2, 3, & 4 do domínio variável da cadeia pesada
20	qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa

Descrição de Anticorpos e Definições

Como mostrado na Figura 1, os anticorpos compreendem tipicamente duas cadeias pesadas ligadas por ligações dissulfeto e duas cadeias leves. Cada cadeia leve é ligada a uma respectiva cadeia pesada por uma ligação de dissulfeto. Cada cadeia pesada compreende em ordem, começando no N-terminal, um domínio variável (região), um domínio constante (região) 1, uma região de dobradiça, e domínios constantes (regiões) 2 e 3. Cada cadeia leve tem um domínio variável (região) no N-terminal e um domínio constante no C-terminal. O domínio variável da cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. O domínio constante da cadeia leve é alinhada com o domínio constante 1 da cadeia pesada. Os domínios constantes nas cadeias leves e pesadas não estão implicados diretamente

na ligação antígeno.

Os domínios variáveis de cada par de cadeias leves e pesadas formam o sítio de ligação ao antígeno. Os domínios nas cadeias leves e pesadas têm a mesma estrutura geral e cada domínio compreende uma estrutura de quatro regiões, cujas sequências são relativamente conservadas, unidas por três regiões de determinação de complementariedade (CDRs). As quatro regiões de estrutura de cada LC e HC adotam amplamente uma conformação beta pregueada e as CDRs formam alças de união, e em alguns casos formando parte da estrutura beta pregueada. As seis CDRs de uma região variável de um anticorpo (três em cada uma das LC e HC) são mantidas na proximidade uma da outra e das regiões de estrutura e formam o sítio de ligação a antígeno. CDRs e regiões de estrutura de anticorpos podem ser determinadas por referência a Kabat ("Sequences of proteins of immunological interest" US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1987).

Aminoácidos das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves maduras de imunoglobulinas são indicados H_x e L_x respectivamente, onde x é um número que indica a posição de aminoácido de acordo com o esquema de Kabat (supra). Kabat lista muitas sequências de aminoácido para anticorpos de cada subgrupo (por exemplo, murino, humano, rato etc.). Kabat usa um método para atribuir um número de resíduos a cada aminoácido em uma sequência listada, e este método para destinar números de resíduo que tornou-se padrão no campo. O esquema de Kabat é extensível a outros anticorpos não incluídos no seu compêndio pelo alinhamento do anticorpo em questão com uma das sequências consenso em Kabat por referência a aminoácidos conservados. O uso da numeração do sistema Kabat prontamente identifica aminoácidos em posições equivalentes em anticorpos diferentes. Por exemplo, aminoácido no L_n (n sendo qualquer número inteiro, dito, por exemplo, 5) a posição de um anticorpo humano ocupa a posição equivalente a uma posição de aminoácido L5 de um anticorpo de camundongo. Quaisquer duas sequências de anticorpos somente podem ser alinhadas de um modo, através do uso do esquema de numeração Kabat (supra). Por isso,

para anticorpos, a identidade porcentual tem um significado único e bem definido.

Como usado neste pedido, o termo "região de estrutura" refere-se àquelas porções das regiões variáveis da cadeia leve e pesada da imunoglobulina que são relativamente conservadas (isto é, com exceção das regiões CDRs) entre diferentes imunoglobulinas em um gênero compreendendo uma ou mais espécies, como definido por Kabat, e outros, supra.

Como usado neste pedido, "anticorpo variante" ou um "variante" refere-se a um anticorpo que tem uma sequência de aminoácidos que se diferencia da sequência de aminoácidos de um anticorpo parental. Tais variantes necessariamente têm menos de 100% de identidade ou similaridade de sequência com o anticorpo parental. Em uma modalidade preferencial, a variante terá uma sequência de aminoácidos que tem de aproximadamente 75% e menos de 100% de identidade ou similaridade com a sequência de aminoácidos domínio variável da cadeia pesada ou leve do anticorpo parental, mais preferencialmente de aproximadamente 80% a menos de 100%, mais preferencialmente de aproximadamente 85% a menos de 100%, mais preferencialmente de aproximadamente 90% a menos de 100%, e ainda mais preferencialmente de aproximadamente 95% a menos de 100%. Identidade ou similaridade com respeito a esta sequência é definida neste pedido como a porcentagem de resíduos de aminoácido na sequência candidata que são idênticos (isto é, mesmo resíduo) com os resíduos do anticorpo parental, após alinhamento das sequências e introduzir lacunas, se necessário, para alcançar a máxima identidade de sequência porcentual. Nenhum N-terminal, C-terminal, ou extensões internas, deleções, ou inserções na sequência do anticorpo fora do domínio variável serão interpretados como afetando a identidade ou similaridade da sequência. O anticorpo variante é geralmente aquele que tem uma substituição de aminoácido na região variável (por um ou mais resíduos de aminoácido; por exemplo, por pelo menos um a aproximadamente vinte e cinco resíduos de aminoácido e preferencialmente por aproximadamente um a aproximadamente dez resíduos de aminoácido) quando comparado à região variável correspondente de um anticorpo paren-

tal.

O anticorpo "parental" como usado neste pedido engloba um anticorpo produzido por um gene que predomina em uma população natural. Também inclui um anticorpo que é de forma mutante natural. Além disso,
5 ainda incluídos estão os anticorpos que foram produzidos ou são suscetíveis a serem produzidos a partir de tal população natural de anticorpos ou a partir de seus mutantes naturais. Tais anticorpos incluem mas não são limitados a anticorpos humanizados ou com superfície recoberta, totalmente humanos, ou anticorpos quimerizados ou qualquer anticorpo, que pode ser criado ou
10 manipulado segundo os ensinamentos da presente invenção. Tais anticorpos geralmente possuem a especificidade de ligação ou possuem resíduos de ligação a antígeno do anticorpo original, mas em alguns casos tais anticorpos também teriam uma especificidade de ligação diferente. Por exemplo, o anticorpo pode mostrar uma especificidade de ligação melhorada a um
15 antígeno, que está parcialmente relacionada ou não-relacionada ao antígeno original.

Um exemplo não-restritivo de um anticorpo parental é "anticorpo parental C242" que refere-se a um anticorpo que tem resíduos de ligação a antígeno do, ou derivado do, anticorpo murino C242 (Patente U.S. Nº
20 5.552.293) ou derivado do mesmo. Por exemplo, o anticorpo monoclonal C242 pode ser um anticorpo monoclonal murino ou um C242 humanizado, quimerizado, totalmente humano, possuindo resíduos de ligação a antígeno de anticorpo monoclonal murino C242.

Terapia direcionada ao alvo, tal como terapia direcionada ao anticorpo, oferece vantagens sobre a terapia não direcionada ao alvo, tais como terapia sistêmica via administração oral ou intravenosa de fármacos ou terapia de corpo total, tal como terapia de radiação externa (XRT). Uma vantagem da terapia direcionada ao anticorpo, e da terapia usando anticorpos monoclonais (MAcs), em particular, é a capacidade de entregar doses de um
25 agente terapêutico a um tumor, com maior proteção do tecido normal dos efeitos do agente terapêutico. Esta terapia direcionada usa MAcs ou conjugados a MAcs desprotegidos a agentes de ligação celular, tais como fáрма-
30

cos, toxinas bacterianas ou outras, radionucleotídeos, e agentes capturadores de nêutrons, tais como adendos de boro.

O termo "epitopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz da ligação específica a uma imunoglobulina. Os determinantes epitópicos normalmente consistem em grupamentos superficiais quimicamente ativos de moléculas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e normalmente têm três características estruturais dimensionais específicas, bem como características de carga específica.

Um resíduo de aminoácido é chamado de um resíduo de estrutura da região variável raro em uma dada posição na sequência da região de estrutura, se for encontrado nesta posição em menos de 10% de todas as sequências de anticorpo em uma grande base de dados de anticorpos murinos.

Um exemplo de uma grande base de dados é a base de dados de Anticorpos Kabat (vide, por exemplo, Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1 ;29(1):205-6.). Um grande banco de dados de anticorpo contém pelo menos 1000 sequências de região variável de anticorpo individual.

Com as definições apresentadas acima, sem estar ligada por uma modalidade particular, a seguinte discussão é oferecida para facilitar o entendimento da invenção.

A presente invenção, em um aspecto não-restritivo, fornece um método para aumentar a produção em células de mamíferos de anticorpos humanizados que têm uma estrutura de núcleo murino da região variável. O método identifica resíduos de aminoácidos não-consenso no núcleo murino da estrutura da região variável e os substitui com o resíduo de aminoácido de uma sequência consenso murino.

Dessa maneira, em uma modalidade, a presente invenção engloba a produção de variantes de anticorpo ou fragmentos do mesmo, em que as variantes são fabricadas pela substituição de um ou mais resíduos de aminoácido em um anticorpo parental com o resíduo correspondente a partir de uma sequência de estrutura da região variável consenso. Como uma

consequência de tal substituição(ões), anticorpos variantes ou fragmentos dos mesmos mostram a síntese de anticorpo aumentada quando introduzidos em uma célula hospedeira quando comparado ao anticorpo parental.

Em um anticorpo parental, a substituição é preferencialmente
5 feita por um ou mais aminoácidos não-consenso, identificados através de alinhamento de cada sequência da região de estrutura de domínio variável da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo parental com uma sequência consenso e região de estrutura de domínio variável da cadeia pesada e da cadeia leve, com o resíduo de aminoácido de sequência consenso
10 correspondente.

Em uma modalidade preferencial, a substituição de resíduos de aminoácido em um anticorpo parental é realizada na cadeia pesada. Em outra modalidade preferencial tal substituição de aminoácido é realizada na cadeia leve. Tal substituição na cadeia pesada ou leve de um anticorpo parental
15 pode ser realizada independentemente ou simultaneamente. A sequência consenso é derivada das sequências de um subgrupo de anticorpos que pertencem às mesmas espécies (por exemplo, murino) ou através das espécies do mesmo gênero (por exemplo, mus ou rattus) ou de todo o gênero ou outra classificação taxonômica de acordo com as suas relações naturais presumidas como aquelas das quais o anticorpo do qual o parental foi
20 derivado.

Em outra modalidade, a invenção fornece um método para aumento da produção de um anticorpo variante ou fragmento do mesmo quando comparado com um anticorpo parental em uma célula hospedeira, o método compreendendo:
25

a) alinhamento de cada sequência da região de estrutura de domínio de variável da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo parental com uma sequência consenso da região de estrutura de domínio variável da cadeia pesada e da cadeia leve, em que a sequência consenso da
30 cadeia pesada ou leve é derivada de um banco de dados de domínios variáveis de anticorpo murino; b) substituição de um ou mais resíduos da cadeia pesada na região da estrutura do domínio variável de anticorpo parental com

um resíduo consenso da cadeia pesada murino ou substituição de um ou mais resíduos da cadeia leve na região de estrutura de domínio variável do anticorpo parental com um resíduo da cadeia leve consenso murino em que a substituição produz o anticorpo variante ou um fragmento do mesmo que quando introduzido na célula hospedeira é produzido em um rendimento maior quando comparado com o anticorpo parental; c) identificação no anticorpo parental de um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados de Q45 ou A70 na cadeia leve, ou um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados de E16, D26, K46 ou T89 na cadeia pesada, o resíduo de aminoácido determinado pelo esquema de numeração de resíduo de anticorpo Kabat; e d) substituição de um ou mais resíduos de aminoácido no anticorpo parental com um ou mais resíduos de aminoácido selecionado de K45 (opcionalmente, K pode ser substituído por um resíduo não-consenso R por considerações biofísicas) ou D70, respectivamente, na cadeia leve, ou um ou mais resíduos de aminoácido selecionados a partir de A16, G26, E46 ou S46 ou V89, respectivamente, na cadeia pesada em que a substituição produz o anticorpo variante ou fragmento do mesmo que quando introduzido na célula hospedeira é produzido em um rendimento maior quando comparado ao anticorpo parental.

20 A substituição na cadeia pesada ou leve pode ser realizada independentemente ou simultaneamente.

Em uma modalidade preferencial, na cadeia leve do anticorpo variante Q45 é substituído por K45 (opcionalmente, K pode ser substituído por um resíduo não-consenso R por considerações biofísicas) e A70 é substituído por D70 e na cadeia pesada do anticorpo variante E16 é substituído por A16; D26 é substituído por G26; K46 é substituído por E46 ou S46; e T89 é substituído por V89. Tal substituição aumenta preferencialmente o rendimento de anticorpo variante em pelo menos aproximadamente 100% ou aproximadamente 200%. Em uma modalidade preferencial, o rendimento é pelo menos aproximadamente 300% ou maior. Em uma modalidade mais preferencial, o rendimento é aproximadamente 400% ou maior. Em uma modalidade ainda mais favorecida, o rendimento é aproximadamente 500% ou

maior. O aumento no rendimento da proteína variante também pode depender de outros fatores, tais como, mas não limitados ao uso de fatores de crescimento ou o uso do meio sem soro para cultura de células.

5 A invenção também engloba um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de codificação C242 inteira murino ou humana, humanizada ou quimerizada que tenha pelo menos uma variação em códons de aminoácido em uma região de codificação para uma sequência de uma região variável da cadeia pesada ou uma região variável da cadeia leve, em que pelo menos uma variação aumenta o rendimento de uma proteína codificada pelo gene C242 e em que a proteína inclui pelo menos uma variação de aminoácido codificada por pelo menos uma variação de códon.

Na substituição de cadeia leve é selecionada a partir das posições da estrutura (esquema de numeração Kabat):

15 Q45 para K45; Opcionalmente, K pode ser substituído por um resíduo não-consenso R por considerações biofísicas.

A70 para D70;

Na cadeia pesada, a substituição é selecionada a partir das posições da estrutura (esquema de numeração Kabat):

20 E16 para A16
D26 para G26
K46 para E46
T89 a V89

Tal substituição de sequência codifica para um produto gênico C242 variante, que é um anticorpo variante.

25 A invenção também engloba um método para aumentar o rendimento de um anticorpo, que é uma variante de um anticorpo parental, de uma cultura de célula hospedeira pela substituição no anticorpo parental de um ou mais resíduos de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (cadeia pesada) ou SEQ ID NO:2 (cadeia leve), o método compreendendo

30 a) alinhamento de SEQ ID NO:1 (cadeia pesada) com uma sequência de cadeia pesada consenso ou SEQ ID NO:2 (cadeia leve) com uma sequência de cadeia leve consenso, em que a sequência de cadeia

pesada ou leve consenso é derivada de um banco de dados de sequências de anticorpo murino (por exemplo, Banco de dados de Kabat - Johnson and Wu, 2001) pelo alinhamento de estruturas da região variável das cadeias pesada e leve de imunoglobulina usando programa de análise de sequência de aminoácidos, tal como Vector NTI (Invitrogen);

b) identificação no anticorpo parental de um ou mais resíduos de aminoácido selecionados a partir de, E16, D26, K46 ou T89 na SEQ ID NO.: 1 e Q45 ou A70 no SEQ ID NO:2 o resíduo de aminoácido determinado pelo esquema Kabat, e

c) substituição de um ou mais dos resíduos de aminoácido; E16, D26, K46 ou T89 na SEQ ID NO:1 e Q45 ou A70 no SEQ ID NO:2 com um resíduo de aminoácido selecionado a partir de A16, G26, E46, S46 ou V89, respectivamente, na SEQ ID NO:1 e K45 (opcionalmente, K pode ser substituído por um resíduo não-consenso R por considerações biofísicas) ou D70, respectivamente, na SEQ ID NO:2, da sequência consenso em que a substituição resulta na produção de um anticorpo variante e em que quando o anticorpo variante é introduzido em uma célula hospedeira, o rendimento da variante é maior do que o anticorpo parental.

Em outra modalidade, a invenção engloba um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo, tal como uma variante de huC242, em que a variante tem uma ou várias substituições de aminoácido em um anticorpo parental que tem uma região variável compreendendo uma cadeia pesada de SEQ ID NO:1 [cadeia pesada huC242] e uma cadeia leve de SEQ ID NO:2 [cadeia leve huC242] e a variante mostra uma síntese melhorada da cadeia leve e/ou pesada, e montagem melhorada da cadeia pesada/leve quando introduzido em uma célula hospedeira única quando comparado ao anticorpo parental, em que a substituição é realizada em uma ou várias posições da região variável da cadeia pesada selecionadas a partir de 16, 26, 46, ou 89 no SEQ ID NO:1 ou posições da região variável da cadeia leve 45 ou 70, no SEQ ID NO:2, ou ambas, as posições que são determinadas por esquema de numeração Kabat. Mais preferencialmente, o anticorpo variante tem substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo com-

posto de resíduos da cadeia leve O45 a K45 (opcionalmente, K pode ser substituído com um resíduo não-consenso R por considerações biofísicas) ou A70 a D70 ou resíduos da cadeia pesada E16 a A16, D26 a G26, K46 a E46, ou T89 a V89 e está localizado na região de estrutura da cadeia pesada ou leve.

Em outra modalidade, o agente de ligação celular da presente invenção também reconhece especificamente um ligante, tal como o antígeno C242 (CD44/CanAg), de forma que o conjugado estará em contato com a célula alvo por um período de tempo suficiente para permitir à porção de agente citotóxico do conjugado atuar sobre a célula, e/ou para permitir ao conjugado tempo suficiente para ser incorporado pela célula.

Em uma modalidade preferencial, os conjugados citotóxicos compreendem uma variante de um anticorpo anti-C242 como a agente de ligação celular, mais preferencialmente o conjugado citotóxico compreende uma variante selecionada a partir de anticorpo ou fragmento do mesmo de ligação ao epitopo A70D; Q45K/R; D26G;K46E; K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; Q45K (R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G. Estes anticorpos são capazes de reconhecer especificamente o antígeno C242 (CD44/CanAg), e direcionar o agente citotóxico a uma célula anormal ou um tecido, tal como células de câncer, de uma maneira direcionada.

O segundo componente dos conjugados citotóxicos da presente invenção é um agente citotóxico. O termo "agente citotóxico" como usado neste pedido refere-se a uma substância que reduz ou bloqueia a função, ou crescimento, de células e/ou causa destruição de células.

Em modalidades preferenciais, o agente citotóxico é um taxol, um maitansinoide, tal como DM1 ou DM4, CC-1065 ou um análogo de CC-1065. Em modalidades preferenciais, os agentes de ligação celular da presente invenção são covalentemente ligados, diretamente ou através de um ligador clivável ou não-clivável, ao agente citotóxico.

Em outra modalidade, o anticorpo humanizado ou um fragmento

de ligação ao epitopo do mesmo pode ser conjugado a um fármaco, tal como um maitansinoide, para formar uma pró-fármaco que tem citotoxicidade específica em direção a células que expressam o antígeno pelo direcionamento do fármaco a um ligante, tal como o antígeno C242 (CD44/CanAg). Conjugados citotóxicos compreendem tais anticorpos e um fármaco pequeno, altamente tóxica (por exemplo, maitansinoides, taxanos, e análogos de CC-1065) podem ser usados como um terapêutico para tratamento de tumores, tais como tumores de mama e ovarianos.

Dessa maneira, em uma modalidade, a variante do anticorpo do anticorpo parental produzida de acordo com os ensinamentos da presente invenção pode ser usada para a terapia direcionada como anticorpos descobertos ou como anticorpos que atuam como agentes de ligação celular.

Agentes Citotóxicos.

O agente citotóxico usado no conjugado citotóxico da presente invenção pode ser qualquer composto que resulta na morte de uma célula, ou induza morte celular, ou de alguma maneira reduza a viabilidade celular. Agentes citotóxicos preferenciais incluem, por exemplo, maitansinoides e análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 e análogos de CC-1065, dolastatina e análogos de dolastatina, definidos abaixo. Estes agentes citotóxicos são conjugados aos anticorpos, fragmentos de anticorpos, equivalentes funcionais, anticorpos melhorados e seus análogos como descrito neste pedido.

Os conjugados citotóxicos podem ser preparados por métodos in vitro. A fim de ligar um fármaco ou pró-fármaco ao anticorpo, um grupo de ligação é usado. Os grupos de ligação adequados são bem conhecidos na técnica e incluem grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos ácido-lábeis, grupos fotolábeis, grupos peptidase-lábeis e grupos esterase-lábeis. Os grupos de ligação preferenciais são grupos dissulfeto e grupos tioéter. Por exemplo, conjugados podem ser construídos usando uma reação de troca de dissulfeto ou pela formação de uma ligação tioéter entre o anticorpo e o fármaco ou pró-fármaco.

Maitansinoides

Entre os agentes citotóxicos que podem ser usados na presente invenção para formar um conjugado citotóxico são maitansinoides e análogos de maitansinoide. Exemplos de maitansinoides adequados incluem maitansinol e análogos de maitansinol. Maitansinoides são fármacos que inibem a formação de microtúbulo e que são altamente tóxicas a células de mamíferos.

Exemplos de análogos de maitansinol adequados incluem os que têm um anel aromático modificado e os que têm modificações em outras posições. Exemplos de alguns maitansinoides adequados são revelados em Patente U.S. Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; e 5.846.545.

Exemplos específicos de análogos adequados de maitansinol que têm um anel aromático modificado incluem:

(1) C-19-decloro (Patente U.S. Nº 4.256.746) (preparado por redução de LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidróxi (ou C-20-demetil) +/-C-19-decloro (Patente U.S. Nos 4.361.650 e 4.307.016) (preparado por demetilação usando Streptomyces ou Actinomyces ou dechlorinação usando LAH); e

(3) C-20-demetóxi, C-20-acilóxi (-OCOR), +/-decloro (Patente U.S. Nº 4.294.757) (preparado por acilação usando cloretos de acila).

Exemplos específicos de análogos de maitansinol adequados que têm modificações de outras posições incluem:

C-9-SH (Patente U.S. Nº 4.424.219) (preparado pela reação de maitansinol com H₂S ou P₂S₅);

C-14-alcoximetil (demetóxi/CH₂OR) (Patente U.S. Nº 4.331, 598);

C-14-hidroximetil ou aciloximetil (CH₂OH ou CH₂OAc) (Patente U.S. Nº 4.450.254) (preparado a partir de Nocardia);

C-15-hidróxi/acilóxi (Patente U.S. Nº 4.364.866) (preparado pela conversão de maitansinol por Streptomyces);

C-15-metóxi (Patente U.S. Nos 4.313.946 e 4.315.929) (isolado

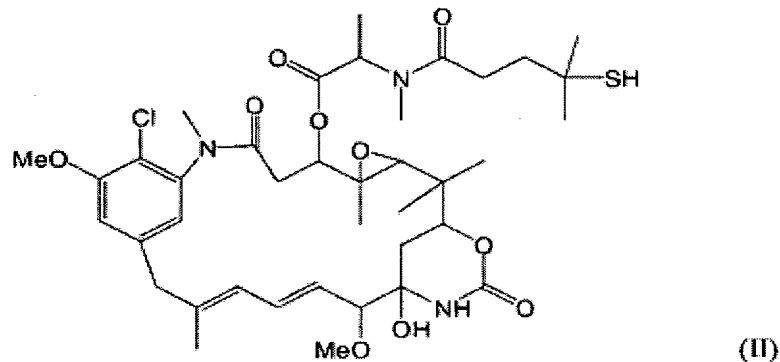
a partir de *Trewia nudiflora*);

C-18-N-demetil (Patente U.S. Nos 4.362.663 e 4.322.348) (preparado através da demetilação de maitansinol por *Streptomyces*); e

5 4,5-desóxi (Patente U.S. Nº 4.371.533) (preparado através da tricloreto de titânio/ redução LAH de maitansinol).

Em uma modalidade preferencial, os conjugados citotóxicos da presente invenção utilizam maitansinoide DM1 que contém tiol, formalmente denominado N²-desacetil-N²-(3-mercaptopropil)-maitansina, como o agente citotóxico. DM1 é representado pela seguinte fórmula estrutural (I):L(I).

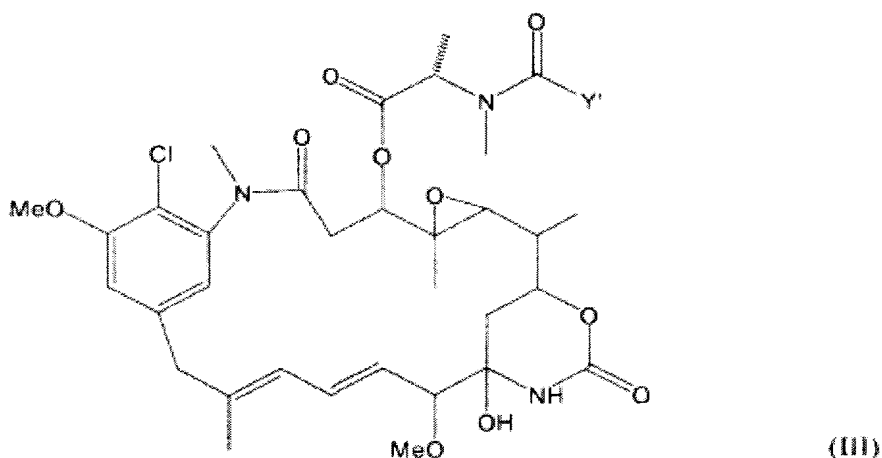
Em outra modalidade preferencial, os conjugados citotóxicos da presente invenção utilizam o maitansinoide DM4 que contém tiol, formalmente denominado N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercaptopentil)-maitansina como o agente citotóxico. DM4 é representado pela seguinte fórmula (II) estrutural:



Em modalidades adicionais da invenção, outras maitansinas, incluindo maitansinoídes que contém tiol e dissulfeto carregando uma substituição mono- ou dialquila do átomo de carbono que carrega o átomo de enxofre, podem ser usadas. Estas incluem um maitansinoíde que têm, no C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidróxi, ou C-20 desmetil, uma cadeia lateral de aminoácido acilada com um grupo acila carregando um grupo sulfidríla impedido, em que o átomo de carbono do grupo acila carregando a função tiol tem um ou dois substituintes, ditos substituintes sendo alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical aro-

mático heterocíclico ou heterocicloalquila, e ainda em que um dos substituintes pode ser H, e em que o grupo acila tem um comprimento de cadeia linear de pelo menos três átomos de carbono entre a função carbonila e o átomo de enxofre.

- 5 Tais maitansinas adicionais incluem compostos representados pela fórmula (III):



em que:

Y' representa



R_1R_2SZ ,

- 10 em que:

R1 e R2 são cada um independentemente alquila ou alquenila linear ou ramificada tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e, além disso,
15 R2 pode ser H;

A, B, D são cicloalquilas ou cicloalquenilas tendo de 3 a 10 átomos de carbono, arila simples ou substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila;

- 20 R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, e R12 são cada um independentemente H, alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical aromático heterocíclico ou hete-

rocicloalquila;

l, m, n, o, p, q, r, s, t e u são cada um independentemente 0 ou um número inteiro de 1 a 5, contanto que pelo menos dois de l, m, n, o, p, q, r, s, t e u não sejam zero a qualquer momento; e

- 5 Z é H, SR ou -COR, em que R é alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila simples ou substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila.

10 Modalidades preferenciais da fórmula (III) incluem compostos da fórmula (III) em que:

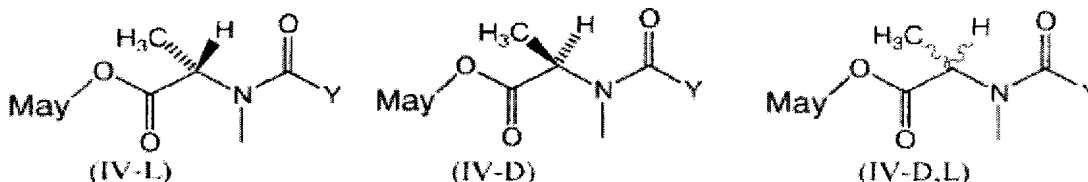
R1 é metila, R2 é H e Z é H.

R1 e R2 são metila e Z é H.

R1 é metila, R2 é H, e Z é -SCH3.

R1 e R2 são metila, e Z é -SCH3.

- 15 Tais maitansinas adicionais também incluem compostos representados pela fórmula (IV-L), (IV-D), ou (IV-D,L):



em que:

Y1 representa (CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ,

- 20 em que:

R1 e R2 são cada um independentemente alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e além disso R2 pode ser H;

- 25

R3, R4, R5, R6, R7 e R8 são cada um independentemente H, alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila;

I, m e n são cada um independentemente um número inteiro de um a 5, e além disso n pode ser 0;

Z é H, SR ou -COR em que R é alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila simples ou substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila; e

Pode representar um maitansinoide que carrega a cadeia lateral em C-3, C-14 hidroximetila, C-15 hidróxi ou C-20 desmetila.

Modalidades preferenciais de fórmulas (IV-L), (IV-D) e (IV-D,L) incluem compostos de fórmulas (IV-L), (IV-D) e (IV-D,L) em que:

R1 é metila, R2 é H, R5, R6, R7, e R8 são cada um H,

I e m são cada um 1, n é 0, Z é H.

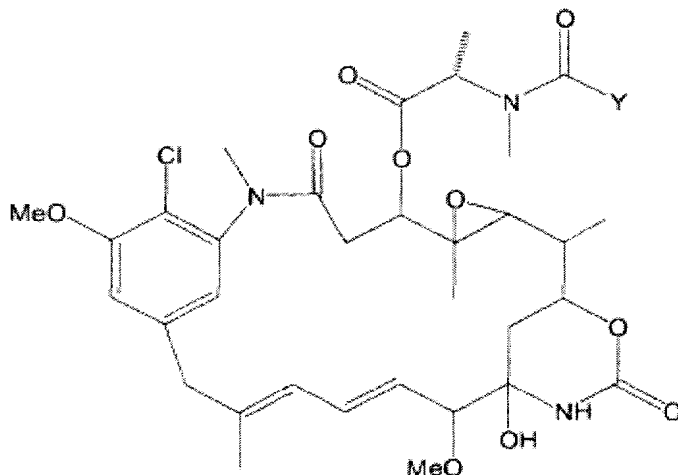
R1 e R2 são metila, R5, R6, R7, R8 são cada um H, I e m são 1, n é 0, e Z é H.

R1 é H, R2 é metila, R5, R6, R7, e R8 são cada um H, I e m são cada um 1, n é 0, e Z é -SCH3.

R1 e R2 são metila, R5, R6, R7, R8 são cada um H, I e m são 1, n é 0, e Z é -SCH3.

Preferencialmente o agente citotóxico é representado pela fórmula (IV-L).

Tais maitansinas adicionais também incluem compostos representados pela fórmula (V):



(V)

em que

Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, em que:

R1 e R2 são cada um independentemente alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e além disso R2 pode ser H;

R3, R4, R5, R6, R7 e R8 são cada um independentemente H, alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila;

l, m e n são cada um independentemente um número inteiro de de 1 a 5, e além disso n pode ser 0; e

Z é H, SR ou -COR, em que R é alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila simples ou substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila.

Modalidades preferenciais da fórmula (V) incluem compostos da fórmula (V) em que:

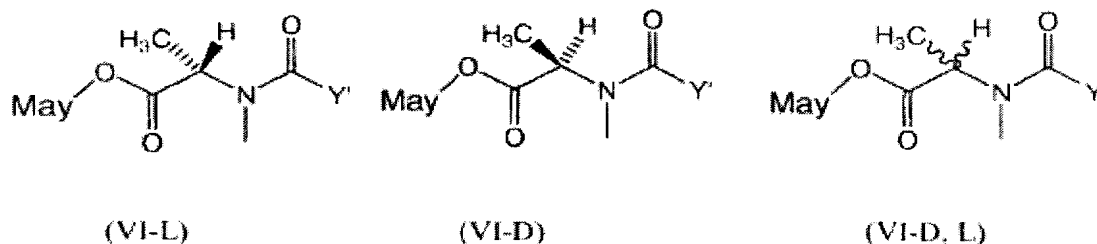
R1 é metila, R2 é H, R5, R6, R7, e R8 são cada um H; l e m são cada um 1; n é 0; e Z é H.

R1 e R2 são metila; R5, R6, R7, R8 são cada um H, l e m são 1; n é 0; e Z é H.

R1 é metila, R2 é H, R5, R6, R7, e R8 são cada um H, l e m são cada um 1, n é 0, e Z é -SCH₃.

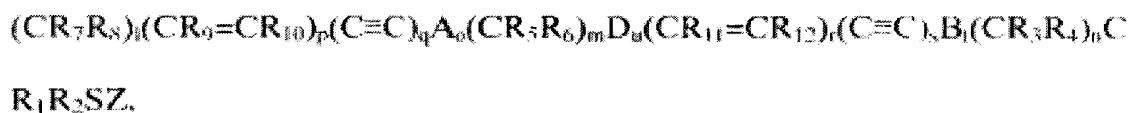
R1 e R2 são metila, R5, R6, R7, R8 são cada um H, l e m são 1, n é 0, e Z é -SCH₃.

Tais maitansinas adicionais incluem ainda compostos representados pela fórmula (VI-L), (VI-D), ou (VI-D,L)



em que:

Y' representa



em que:

R1 e R2 são cada um independentemente alquila ou alquenila
 5 linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou
 cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radi-
 cal aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e além disso R2 pode ser
 H;

A, B, D são cicloalquila ou cicloalquenila tendo de 3 a 10 átomos
 10 de carbono, arila simples ou substituída ou radical aromático heterocíclico ou
 heterocicloalquila;

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, e R12 são cada um in-
 dependentemente H, alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de
 15 carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de
 carbono, fenila, fenila substituída ou radical aromático heterocíclico ou hete-
 rocicloalquila;

l, m, n, o, p, q, r, s, t e u são cada um independentemente 0 ou
 um número inteiro de 1 a 5, contanto que pelo menos dois de l, m, n, o, p, q,
 r, s, t e u não sejam zero a qualquer momento;

Z é H, SR ou -COR, em que R é alquila ou alquenila linear tendo
 20 de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica ten-
 do de 3 a 10 átomos de carbono, ou arila simples ou substituída ou radical
 aromático heterocíclico ou heterocicloalquila; e

Pode ser um maitansinoide.

25 Modalidades preferenciais da fórmula (VI) incluem compostos da

fórmula (VI) em que:

R1 é metila, R2 é H e Z é H.

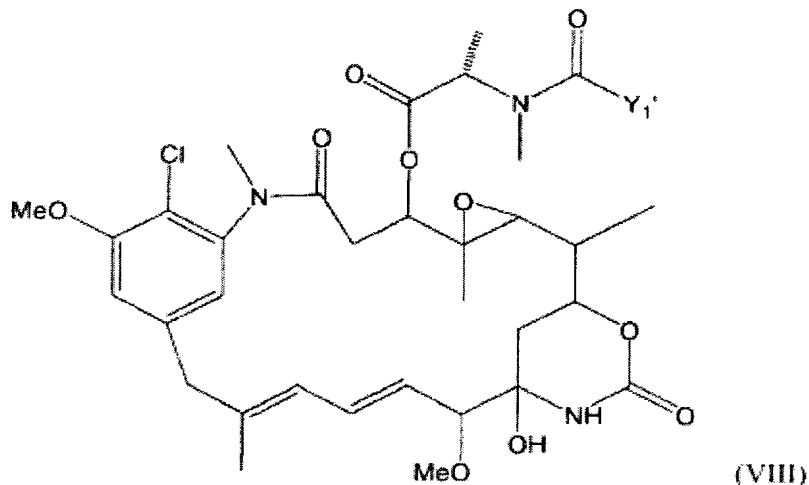
R1 e R2 são metila e Z é H.

R1 é metila, R2 é H, e Z é -SCH₃.

5 R1 e R2 são metila, e Z é -SCH₃.

Os maitansinoides supracitados podem estar conjugados ao anticorpo anti-C242 variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E; K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; Q45K(R)/K46E/T89V; 10 A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G ou um homólogo ou fragmento do mesmo, em que o anticorpo é ligado ao maitansinoide utilizando funcionalidade tiol ou dissulfeto que está presente no grupo acila de uma cadeia lateral de aminoácido acilado encontrada em C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidróxi ou C-20 desmetil 15 do maitansinoide, e em que o grupo acila do cadeia lateral do aminoácido acilado tem sua funcionalidade tiol ou de dissulfeto localizada em um átomo de carbono que tem um ou dois substituintes, ditos substituintes sendo alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila 20 substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e além disso um dos substituintes pode ser H, e em que o grupo acila tem um comprimento de cadeia linear de pelo menos três átomos de carbono entre a funcionalidade carbonila e o átomo de enxofre.

Um conjugado preferencial da presente invenção é aquele compreendendo a variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E; K46E/T89V; 25 K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; Q45K(R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G ou um homólogo ou fragmento da mesma, conjugado 30 a um maitansinoide da fórmula (VIII):



em que:

Y1' representa



$R_1R_2S^+$,

em que:

R1 e R2 são cada um independentemente CH3, C2H5, alquila
 5 ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila
 ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substi-
 tuída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e, além disso,
 R2 pode ser H;

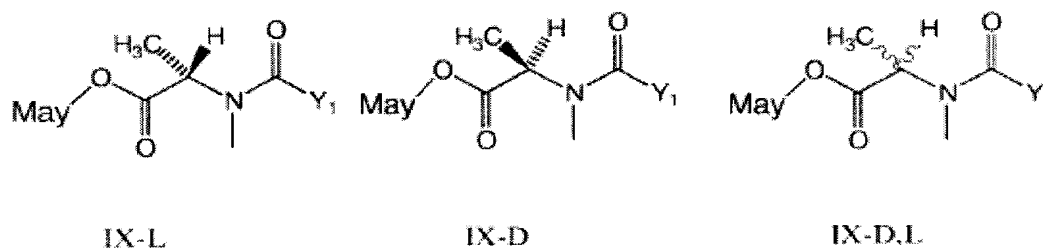
A, B, D são cada um independentemente cicloalquila ou cicloal-
 10 quenila tendo de 3 a 10 átomos de carbono, arila simples ou substituída ou
 radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila;

R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, e R12 são cada um in-
 dependentemente H, alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de
 carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de
 15 carbono, fenila, fenila substituída ou radical aromático heterocíclico ou hete-
 rocicloalquila;

l, m, n, o, p, q, r, s, t e u são cada um independentemente 0 ou
 um número inteiro de 1 a 5, contanto que pelo menos dois de l, m, n, o, p, q,
 r, s, t e u não sejam zero a qualquer momento;

20 Preferencialmente, R1 é metila, R2 é H ou R1 e R2 são metila.

Um conjugado ainda mais preferencial da presente invenção é aquele que compreende o anticorpo anti-C242 variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E; K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; 5 A70D/K46E; Q45K(R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G ou um homólogo ou fragmento do mesmo, conjugado a um maitansinoide de fórmula (IX-L), (IX-D), ou (IX-D,L)



em que

10 Y1 representa (CR7R8)1(CR5R6)m(CR3R4)nCR1R2S-, em que:
R1 e R2 são cada um independentemente alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila, e, além disso, R2 pode ser 15 H;

R3, R4, R5, R6, R7 e R8 são cada um independentemente H, alquila ou alquenila linear tendo de 1 a 10 átomos de carbono, alquila ou alquenila ramificada ou cíclica tendo de 3 a 10 átomos de carbono, fenila, fenila substituída, ou radical aromático heterocíclico ou heterocicloalquila;

20 l, m e n são cada um independentemente um número inteiro de 1 a 5, e além disso n pode ser 0; e

Pode representar um maitansinol que carrega a cadeia lateral em C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidróxi ou C-20 desmetil.

25 Modalidades preferenciais de fórmulas (IX-L), (IX-D) e (IX-D,L) incluem compostos de fórmulas (IX-L), (IX-D) e (IX-D,L) em que:

R1 é metila, R2 é H, ou R1 e R2 são metila.

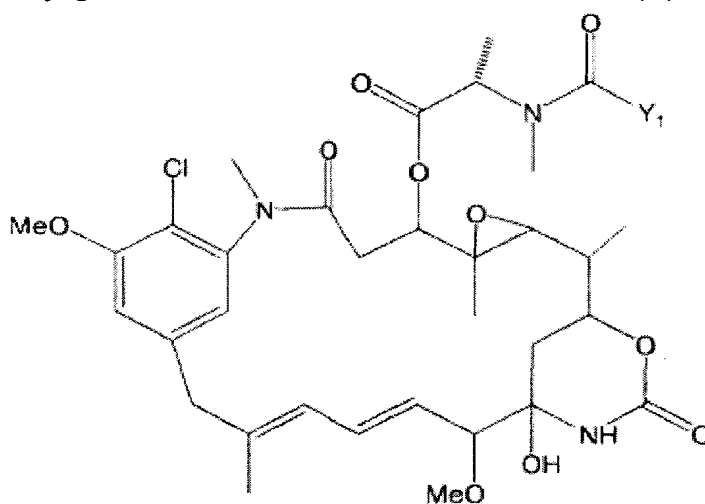
R1 é metila, R2 é H; R5, R6, R7, R8 são cada um H, l e m são

cada um 1; n é 0,

R1 e R2 são metila; R5, R6, R7, e R8 são cada um H, l e m são 1, n é 0.

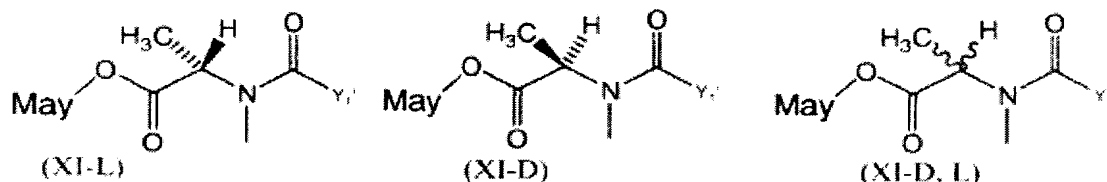
5 Preferencialmente o agente citotóxico é representado pela fórmula (IX-L).

Um conjugado adicional preferencial da presente invenção é aquele que compreende o anticorpo anti-C242 variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E; K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; 10 Q45K(R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G ou um homólogo ou fragmento do mesmo, conjugados a um maitansinoide da fórmula (X):



em que os substituintes são como definidos para a fórmula (IX) acima.

Um conjugado adicional preferencial da presente invenção é aquele que compreende o anticorpo anti-C242 variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E; K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; 15 Q45K(R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G ou um homólogo ou fragmento do mesmo, conjugados a um maitansinoide da fórmula (XI): 20



em que os substituintes são como definidos para a fórmula (VIII) acima.

Especialmente preferenciais são quaisquer compostos descritos acima, em que R1 é H, R2 é metila, R5, R6, R7 e R8 são cada um H, l e m são cada 1, e n é 0.

5 Além disso, especialmente preferenciais são quaisquer dos compostos descritos acima, em que R1 e R2 são metila, R5, R6, R7, R8 são cada um H, l e m são 1, e n é 0.

Além disso, o estereoisômero L-aminoacila é preferencial.

10 Exemplos de alquilas ou alquenilas lineares tendo de 1 a 10 átomos de carbono incluem, mas não são limitados a, metila, etila, propila, butila, pentila, hexila, propenila, butenila e hexenila.

Exemplos de alquilas ou alquenilas ramificadas tendo de 3 a 10 átomos de carbono incluem, mas não são limitados a, isopropila, isobutila, sec-butila, terc-butila, isopentila, 1-etil-propila, isobutenila e isopentenila.

15 Exemplos de alquilas ou alquenilas cíclicas tendo de 3 a 10 átomos de carbono incluem, mas não são limitados a, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, ciclopentenila, e ciclo-hexenila.

20 Arilas simples incluem arilas que têm de 6 a 10 átomos de carbono, e arilas substituídas incluem arilas que têm de 6 a 10 átomos de carbono que carregam pelo menos um substituinte alquila que contém de 1 a 4 átomos de carbono, ou substituinte alcóxi, tal como metóxi, etóxi, ou um substituinte halogênio ou um substituinte nitro.

Exemplos de arila simples que contém de 6 a 10 átomos de carbono incluem o fenila e naftila.

25 Exemplos de arila substituída incluem nitrofenil, dinitrofenil.

Radicais aromáticos heterocíclicos incluem grupos que têm anéis de 3 a 10 membros contendo um ou dois heteroátomos selecionados de N, O ou S.

Radicais heterocicloalquila incluem compostos cíclicos, compreendendo sistemas de anéis de 3 a 10 membros, contendo um ou dois heteroátomos, selecionados de N, O, ou S.

Exemplos de radicais aromáticos heterocíclicos incluem piridila, 5 nitro-piridila, pirolila, oxazolila, tienila, tiazolila, e furila.

Exemplos de radicais heteroalquila incluem di-hidrofurila, tetra-hidrofurila, tetra-hidropirolila, piperidinila, piperazinila, e morfolino.

Cada um dos maitansinoides ensinados em Patente U.S. N. 7.276.497 também podem ser usados no conjugado citotóxico da presente 10 invenção. A revelação inteira de Patente U.S. N. 7.276.497 é incorporada neste pedido por referência.

Grupos de ligação contendo dissulfeto

A fim de ligar o maitansinoide a um anticorpo, tal como o anti- 15 corpo anti C242 variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E; K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; Q45K(R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G, o maitansinoide compreende uma porção de ligação. A porção de ligação contém uma ligação química que leva em conta a libe- 20 ração de maitansinoides totalmente ativos em um determinado sítio. Ligações químicas adequadas são bem conhecidas na técnica e incluem ligações dissulfeto, ligações ácido-lábeis, ligações fotolábeis, ligações peptidase-lábeis e ligações esterase-lábeis. São preferenciais ligações dissulfeto.

A porção de ligação também compreende um grupo químico reativo. Em uma modalidade preferencial, o grupo químico reativo pode estar 25 covalentemente ligado ao maitansinoide através de uma porção de ligação ligada ao dissulfeto.

Grupos químicos reativos particularmente preferenciais são ésteres de N-succinimidila e ésteres de N-sulfossuccinimidila.

Maitansinoides particularmente preferenciais compreendendo 30 uma porção de ligação que contém um grupo químico reativo são ésteres C-3 de maitansinol e seus análogos onde a porção de ligação contém uma li-

gação dissulfeto e o grupo reativo químico compreende um éster de N-succinimidila ou N-sulfossuccinimidila.

Muitas posições em maitansinoides podem servir como a posição para ligar-se quimicamente a porção de ligação. Por exemplo, a posição
5 C-3 tendo um grupo hidroxila, a posição C-14 modificada com hidroximetila, a posição C-15 modificada com hidróxi e a posição C-20 tendo um grupo hidróxi são todos esperados a serem úteis. Entretanto, a posição C-3 é preferencial e a posição C3 de maitansinol é especialmente preferencial.

Enquanto a síntese de ésteres de maitansinol que tem uma porção
10 de ligação é descrita quanto a porções de ligação contendo ligação dissulfeto, um versado na técnica entenderá que porções de ligação com outras ligações químicas (como descrito acima) também podem ser usadas com a presente invenção, como podem outros maitansinoides. Exemplos específicos de outras ligações químicas incluem ligações ácido-lábeis, ligações foto-
15 lábeis, ligações peptidase-lábeis e ligações esterase-lábeis. A descrição de Patente U.S. N. 5.208.020, incorporado neste pedido, ensina a produção de maitansinoides carregando tais ligações.

A síntese de maitansinoides e derivados de maitansinoides que têm uma porção dissulfeto que carrega um grupo reativo são descritos em
20 Patente U.S. N^{os} 6.441.163 e 6.333.410, e Patente U.S. Publication No. 2003-0055226 A1, cada uma dos quais é neste pedido incorporado por referência.

Os maitansinoides contendo grupo reativo, tal como DM1, são reagidos com um anticorpo anti-C242 variante A70D; Q45K/R; D26G; K46E;
25 K46E/T89V; K46E/K82S; K46E/E16A/D26G; A70D/K46E/T89V; K46E/D26G; K46E/K82S/D26G; K46E/T89V/D26G; A70D/K46E; Q45K(R)/K46E/T89V; A70D/D26G; Q45K(R)/K46E; A70D/K46E/D26G; Q45K(R)/D26G; Q45K(R)/K46E/D26G, para produzir conjugado citotóxico. Estes conjugados podem ser purificados por HPLC ou por filtração em gel.

Vários esquemas excelentes para produção de tais conjugados anticorpo-maitansinoide são fornecidos em Patente U.S. Nos. 6.333.410, 6.411.163 e 6.716.821 e Patente U.S. No. 2003-0055226 A1, cada um dos

quais é incorporado neste pedido em sua totalidade.

Em geral, uma solução de um anticorpo em tampão aquoso pode ser incubada com um excesso molar de maitansinoides tendo uma porção de dissulfeto que porta um grupo reativo. A mistura de reação pode ser
5 extinta pela adição de amina em excesso (tal como etanolamina, taurina, etc.). O conjugado maitansinoide-anticorpo então pode ser purificado pela filtração em gel.

O número de moléculas maitansinoides ligadas por molécula de anticorpo pode ser determinado medindo espectrofotometricamente a faixa
10 da absorvância em 252 nm e 280 nm. Uma média de 1 a 10 de moléculas de maitansinoides/ molécula de anticorpo é preferencial.

Conjugados de anticorpos com fármacos maitansinoides podem ser avaliados pela sua capacidade de suprimir a proliferação de várias linhagens celulares não desejadas in vitro. Por exemplo, linhagens celulares, tais
15 como a linhagem de carcinoma epidermóide humano A-431, a linhagem celular de câncer de pulmão de pequenas células humano SW2, a linhagem de tumor de mama humana SKBR3 e a linhagem de linfoma de Burkitt Namalwa podem ser facilmente usadas para a avaliação de citotoxicidade destes compostos. Células a serem avaliadas podem ser expostas aos compostos
20 durante 24 horas e as frações de sobrevivência das células medidas em ensaios diretos por métodos conhecidos. Valores de IC50 podem então ser calculados a partir dos resultados dos ensaios.

Grupos de ligação contendo PEG

Maitansinoides também podem ser ligados a anticorpos usando
25 grupos de ligação PEG, como apresentado em U.S Patent No. 6.716.821. Estes grupos de ligação de PEG são solúveis tanto na água como em solventes não-aquosos, e podem ser usados para juntar um ou mais agentes citotóxicos a um agente de ligação celular. Exemplos de grupos de ligação a PEG incluem ligantes de PEG hetero-bifuncionais que se ligam a agentes
30 citotóxicos e agentes de ligação celular em extremidades opostas dos ligantes através de um grupo funcional sulfidríla ou dissulfeto em uma extremidade, e um éster ativo em outra extremidade.

Como um exemplo geral da síntese de um conjugado citotóxico utilizando um grupo de ligação a PEG, referência é novamente feita a U.S Patent. 6.716.821 para detalhes específicos. A síntese começa com a reação de um ou mais agentes citotóxicos que portam uma porção de PEG reativa com um anticorpo, resultando no deslocamento do éster ativo terminal de cada porção de PEG reativa por um resíduo de aminoácido do anticorpo, para render um conjugado citotóxico compreendendo um ou mais agentes citotóxicos covalentemente ligados a um anticorpo através de um grupo de ligação a PEG.

10 Outros grupos de ligação

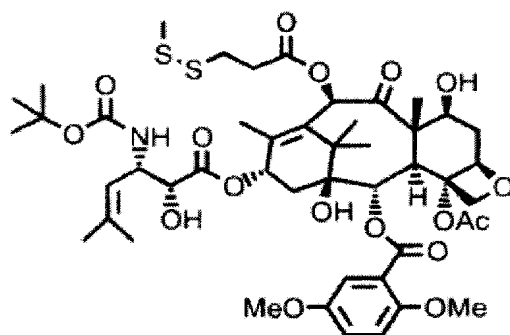
Conjugados de maitansinoide compreendendo ligadores não-cliváveis são descritos em Patente U.S. Nº 2005-0169933 A1, a descrição inteira do qual é incorporada neste pedido por referência.

Taxanos

15 O agente tóxico usado nos conjugados citotóxicos de acordo com a presente invenção também pode ser um taxano ou derivados do mesmo.

Taxanos são uma família de compostos que inclui paclitaxel (Taxol), um produto natural citotóxico, e docetaxel (Taxotere), um derivado semissintético, dois compostos que são largamente usados no tratamento de 20 câncer. Taxanos são toxinas para o fuso mitótico que inibem a despolimerização da tubulina, resultando em morte celular. Enquanto docetaxel e paclitaxel são agentes úteis no tratamento de câncer, a sua atividade antitumoral é limitada por causa da sua toxicidade não-específica em relação a células 25 normais. Além disso, os compostos como os próprios paclitaxel e docetaxel não são suficientemente potentes para serem usados em conjugados de agentes de ligação celular.

Um taxano preferencial para uso na preparação de conjugados citotóxicos é o taxano da fórmula (XI):



(XI)

Métodos para sintetizar taxanos exemplares que pode ser usados nos conjugados citotóxicos da presente invenção, junto com métodos para conjugar os taxanos a agentes de ligação celular, tais como anticorpos, são descritos detalhadamente em Patente U.S. Nos. 5.416.064, 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738, 6.436.931, 6.596.757, 6.706.708 e 6.716.821 e em Patente U.S. No. 2004-0024049 A1.

Análogos CC-1065

O agente tóxico usado nos conjugados citotóxicos de acordo com a presente invenção também pode ser CC-1065 ou derivado do mesmo.

CC-1065 é um antibiótico antitumoral potente isolado a partir do caldo de cultura de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 é aproximadamente 1000 vezes mais potente in vitro do que são os fármacos anti-câncer comumente usados, tais como doxorrubicina, metotrexato e vincristina (B.K. Bhuyan e outros, *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982)). Exemplos não-restritivos de CC-1065 e seus análogos adequados para uso na presente invenção são descritos em Patente U.S. N^os 6.372.738, 6.340.701, 5.846.545 e 5.585.499.

A potência citotóxica do CC-1065 foi correlacionada com sua atividade alquilante e sua atividade de ligação ao DNA ou intercalante de DNA. Estas duas atividades residem em partes separadas da molécula. Dessa maneira, a atividade alquilante é contida na subunidade ciclopropapirrolindol (CPI) e a atividade de ligação ao DNA reside em duas subunidades pirroloindol.

Embora CC-1065 tenha certas características atraentes como um agente citotóxico, tem limitações no uso terapêutico. Administração de CC-1065 a camundongos causou uma hepatotoxicidade retardada levando a

mortalidade no dia 50 após uma dose intravenosa única de 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ {V.L. Reynolds e al., J. Antibiotics, XXIX, 319-334 (1986)}. Isto estimulou esforços para desenvolver análogos que não causam a toxicidade retardada, e a síntese de análogos mais simples modelados no CC-1065 foram descritas

5 {M.A. Warpehoski e outros, J. Med. Chem., 31, 590-603 (1988)}.

Em outra série de análogos úteis na presente invenção, a porção CPI foi substituída por uma porção ciclopropabenzindol (CBI) {D.L. Boger e outros, J. Org. Chem., 55, 5823-5833, (1990), D.L. Boger e outros, BioOrg. Med. Chem. Lett., 1, 115-120 (1991)}. Estes compostos mantêm a alta po-

10 tência in vitro do fármaco parental, sem causar a toxicidade retardada em camundongos. Como CC-1065, estes compostos são agentes alquilantes que se ligam ao sulco menor do DNA de uma maneira covalente para causar a morte celular. Entretanto, a avaliação clínica dos análogos mais promissores, Adozelesin e Carzelesin, têm levado a resultados decepcionantes {B.F.

15 Foster e outros, Investigational New Drugs, 13, 321-326 (1996); I. Wolff e outros, Clin. Cancer Res., 2, 1717-1723 (1996)}. Estes fármacos apresentam baixos efeitos terapêuticos por causa da sua alta toxicidade sistêmica.

A eficácia terapêutica dos análogos de CC-1065 pode ser muito melhorada pela modificação pela distribuição in vivo através da entrega dire-

20 cionada ao sítio tumoral, resultando em menor toxicidade para tecidos não-direcionados, e dessa maneira, menor toxicidade sistêmica. A fim de alcançar este objetivo, conjugados de análogos e derivados de CC-1065 com agentes de ligação celular que visam especificamente células tumorais foram descritos {US Patents; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545}. Estes conjugados

25 tipicamente apresentam alta citotoxicidade alvo específica in vitro, e excepcional atividade antitumoral em modelos de xenoenxerto de tumor humano em camundongos {R.V. J. Chari e outros, Cancer Res., 55, 4079-4084 (1995)}.

Os métodos para sintetizar análogos de CC-1065 que podem ser

30 usados nos conjugados citotóxicos da presente invenção, junto com métodos para conjugar os análogos a agentes de ligação celular, tais como anticorpos, são descritos detalhadamente em Patente U.S. Nos. 5.475.092,

5.846.545, 5.585.499, 6.534.660, 6.586.618 e 6.756.397 e no Pedido de Patente U.S. Nº 2003-0195365 A1.

Outros fármacos

Fármacos, tais como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, tubulisina e análogos de tubulisina, duocarmicina e análogos de duocarmicina, dolastatina e análogos de dolastatina, tais como auristatinas e análogos, são também adequados para a preparação de conjugados da presente invenção. As moléculas de fármaco também podem ser ligadas às moléculas de anticorpos através de uma molécula veículo intermediária, tal como albumina sérica. Compostos Doxorubicina e Danorrubicina, como descritos, por exemplo, em Série U.S. Nº 09/740991, também podem ser agentes citotóxicos úteis. Estes fármacos também podem ser usados para a coterapia como discutido abaixo.

15 Coterapia

A frase "terapia de combinação" (ou "coterapia"), significa o uso de um anticorpo variante, tal como uma variante do anticorpo huC242, um agente quimioterápico, ou um imunotoxina, e é destinada incluir administração de cada agente em uma maneira sequencial em um regime que fornecerá efeitos benéficos da combinação de fármacos. Coterapia é destinada da mesma forma para incluir a coadministração destes agentes em uma maneira simultânea substancialmente, tal como pela ingestão de uma dosagem única que tem uma proporção fixada destes agentes ativos ou ingestão de múltiplos medicamentos, separados de cada agente. "Terapia de combinação" também inclui a administração simultânea ou sequencial por via intravenosa, intramusculares ou outra parenteral, no corpo, inclusive a absorção direta através tecidos membranosos de mucosas, como encontrado nas passagens dos seios. Administração sequencial também inclui combinações de fármacos onde os elementos individuais podem ser administrados em tempos diferentes e/ou por vias diferentes mas que atuam em combinação para fornecer um efeito benéfico.

A frase "terapeuticamente eficaz" é destinada a qualificar a

quantidade de cada agente para uso na terapia de combinação que alcançará o objetivo de melhorar a redução ou prevenção tumoral, por exemplo, a progressão de tumores, evitando efeitos colaterais adversos tipicamente associados com cada agente.

5 Uma terapia de combinação preferencial consistiria essencialmente em dois ou mais agentes ativos, ou seja, um anticorpo huC242 variante descoberto ou um conjugado do mesmo e outro agente selecionado de uma imunotoxina, um agente quimioterápico, um imunomodulador ou um anticorpo, que se diferencia do anticorpo variante. Os agentes seriam usados em combinação em uma faixa de variação de peso de aproximadamente 10 0,5 para um a aproximadamente vinte para um do anticorpo descoberto ou conjugado do mesmo a qualquer um dos outros agentes. Uma faixa preferencial destes dois agentes seria de aproximadamente um para um a aproximadamente quinze para um, enquanto uma faixa mais preferencial seria de aproximadamente um para um a aproximadamente cinco para um, dependendo no final da seleção do anticorpo ou conjugado e qualquer um dos outros agente. Dependendo das necessidades do paciente, a proporção do anticorpo ou conjugado do mesmo, e outro agente também pode ser invertida. Por exemplo, após o tratamento inicial, se um paciente é encontra-se 15 mais responsivo a uma dose maior de um dos outros agentes quando comparado ao anticorpo descoberto variante ou um conjugado do mesmo, um provedor de tal medicação pode trocar a proporção para fazer o tratamento mais eficaz. A preparação de imunotoxinas é geralmente bem conhecida na técnica (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.340.535, incorporado neste 20 pedido por referência). Cada uma das seguintes patentes e pedidos de patentes são incorporados neste pedido por referência para os efeitos ainda mais completos dos presentes ensinamentos quanto à geração, purificação e uso da imunotoxina: U.S. Pat. Nos. 5.855.866; 5.776.427; 5.863.538; 6.004.554; 5.965.132; 6.051.230; e 5.660.827; e U.S. Application Ser. No. 25 07/846.349.

30 Anticorpos variante, tais como uma variante de huC242, também podem estar ligados diretamente ou indiretamente a um imunomodulador.

Entre os modificadores de resposta biológica (tais como um imunomodulador) que de algum modo pode aumentar a destruição do tumor pelo anticorpo desta invenção estão incluídos linfocinas, tais como: Fator de Necrose Tumoral, Fator de Ativação de Macrófago, Fator de Estimulação de Colônia, Interferons, etc.

Quando a coterapia envolve um complexo injetável, pode compreender ainda um agente terapêutico selecionado do grupo composto de hormônios, imunossuppressores, antibióticos, citostáticos, diuréticos, agentes gastrintestinais, agentes cardiovasculares, agentes anti-inflamatórios, analgésicos, anestésicos locais, e um agente neurofarmacológico, em que estes agentes são administrados para reduzir o risco de qualquer efeito colateral.

Composição Terapêutica

A invenção também refere-se a uma composição terapêutica para tratamento de um distúrbio hiperproliferativa em um mamífero que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo variante da invenção e veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é para o tratamento de câncer do pulmão, mama, cólon, próstata, rim, pâncreas, ovário, cérvix e órgãos linfáticos, osteossarcoma, carcinoma sinovial, um sarcoma ou um carcinoma na qual CanAg está expresso, e ainda outros cânceres para serem determinados no quais CanAg está predominantemente expresso. Em outra modalidade, a composição farmacêutica refere-se ao tratamento de outros distúrbios tais como, por exemplo, doenças autoimunes, tais como lupus sistêmico, artrite reumatóide, e esclerose múltipla; rejeições a enxerto, tais como rejeição a transplante renal, rejeição a transplante de fígado, rejeição a transplante de pulmão, rejeição a transplante cardíaco, e rejeição a transplante de medula óssea; doença do enxerto contra o hospedeiro; infecções virais, tais como infecção por mV, infecção por HIV, AIDS, etc.; e infecções parasitárias, tais como giardíase, amebíase, esquistossomose, e outros como determinadas por um versado na técnica ordinária.

A invenção imediata fornece composições farmacêuticas com-

preendendo:

uma quantidade eficaz de um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo da presente invenção, e

um veículo farmacologicamente aceitável, que pode ser inerte ou fisiologicamente ativo.

Como usado neste pedido, "veículos farmacologicamente aceitáveis" incluem todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, e similares que são fisiologicamente compatíveis. Exemplos dos veículos, excipientes e/ou diluentes adequados incluem um ou mais de água, solução salina, de solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol, e similares, bem como combinações dos mesmos. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, tais como açúcar, polialcoois, ou cloreto de sódio na composição. Em particular, exemplos relevantes de veículos adequados incluem: (1) solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, contendo ou não contendo aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albumina sérica humana, (2) solução salina a 0,9% (cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v) e (3) dextrose a 5% (p/v); e também pode conter um antioxidante, tal como triptamina e um agente estabilizante, tal como Tween 20.

As composições neste pedido também podem conter um agente terapêutico adicional, segundo a necessidade para um distúrbio particular que é tratado. Preferencialmente, o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo da presente invenção, e o composto ativo suplementar terão atividades complementares, que não afetam adversamente um ao outro. Em uma modalidade preferencial, o agente terapêutico adicional é antagonista do fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator tecidual (TF), proteína C, proteína S, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), ou receptor HER2.

As composições da invenção podem estar em várias formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquida, semissólida, e sólida, mas a forma preferencial depende do modo desejado de administração e aplicação terapêutica. Composições típicas preferenciais estão na forma de

5 soluções injetáveis ou infusíveis. O modo preferencial da administração é parenteral (por exemplo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutâneo). Em uma modalidade preferencial, as composições da invenção são administradas intravenosamente como um bolus ou pela infusão contínua durante o período do tempo. Em outra modalidade preferencial, são injeta-

10 dos por via intramuscular, subcutâneo, intra-articular, intrassinovial, intratumoral, peritumoral, intralesional, ou perilesional, para exercer efeitos terapêuticos locais bem como sistêmicos.

Composições estéreis para administração parenteral podem ser preparadas pela incorporação de anticorpo variante ou fragmento de ligação

15 a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e o anticorpo variante ou fragmento de ligação ao epitopo do mesmo da presente invenção na quantidade necessária no solvente apropriado, seguido pela esterilização por microfiltração. Como solvente ou veículo, pode ser usado água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol,

20 etanol, e similares, bem como combinações dos mesmos. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, poliálcoois, ou cloreto de sódio na composição. Estas composições também podem conter adjuvantes, em particular, agentes umectantes, isotonizantes, emulsificantes, dispersantes e estabilizantes. Composições estéreis para administração

25 parenteral também podem ser preparadas na forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas no momento do uso em água estéril ou qualquer outro meio estéril injetável.

Anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e o anticorpo variante ou fragmen-

30 to de ligação a epitopo do mesmo da presente invenção também podem ser administrados oralmente. Como composições sólidas para administração oral, pastilhas, pílulas, pós (cápsulas gelatinosas, sachês) ou grânulos po-

dem ser usados. Nestas composições, o ingrediente ativo de acordo com a invenção é misturado com um ou mais diluentes inertes, tais como amido, celulose, sacarose, lactose ou sílica, sob uma corrente de argônio. Estas composições também podem compreender substâncias com exceção de diluentes, por exemplo, um ou mais lubrificantes, tais como estearato de magnésio ou talco, um colorante, um revestimento (pastilha revestida de açúcar) ou um esmalte.

Como composições líquidas para administração oral, podem ser usadas soluções farmacologicamente aceitáveis, suspensões, emulsões, xaropes e elixires contendo diluentes inertes, tais como água, etanol, glicerol, óleos vegetais ou óleo de parafina. Estas composições podem compreender substâncias com exceção de diluentes, por exemplo, produtos umectantes, adoçantes, espessantes, flavorizantes ou estabilizantes de produtos.

As doses dependem do efeito desejado, a duração do tratamento e a via da administração usada; estão geralmente entre 5 mg e 1000 mg por dia oralmente para um adulto com doses unitárias nos limites de 1 mg a 250 mg da substância ativa. Em geral, o médico determinará a dosagem apropriada dependendo da idade, peso e quaisquer outros fatores específicos para o indivíduo a ser tratado.

A melhoria ou os anticorpos variantes ou o conjugados dos mesmos da presente invenção pode ser usado em formulações terapêuticas como um agonista ou antagonista que são preparados para armazenamento pela mistura das variantes ou dos conjugados dos mesmos que têm o grau desejado de pureza com opcionais veículos, excipientes ou estabilizadores fisiologicamente aceitáveis, [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980); Pedido de Patente N°: 10/846.129], na forma de soluções aquosas ou formulações liofilizadas. Veículos, excipientes, ou estabilizadores aceitáveis são não-tóxicos aos recipientes nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões, tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como octadecildimetilbenzil cloreto de amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butila ou

benzil álcool; parabenos de alquila, tal como parabeno de metila ou propila; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal, tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônico, tal como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

As variantes também podem ser formuladas em lipossomos. Lipossomos que contêm a molécula do interesse são preparados por métodos conhecidos na técnica, tal como descritos em Epstein e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang e outros, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); e Patente U.S. Nos 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomos com o tempo de circulação aumentado são descritos em Patente U.S. No. 5.013.556.

Imunolipossomos particularmente úteis pode ser gerados pelo método de evaporação em fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Lipossomas são expulsos através de filtros do tamanho de poro definido para produzir lipossomos com diâmetro desejado. Fragmentos Fab de um anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomos como descrito em Martin e outros, J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) através de uma reação de permutação de dissulfeto. Um agente quimioterápico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente contido no lipossomo. Vide Gabizon e outros, J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989).

A formulação neste pedido também pode conter mais de um composto ativo como necessária para indicação particular que é tratada, preferencialmente aquelas atividades complementares que não afetam adversamente um ao outro. Tais moléculas estão presentes apropriadamente em

combinação em quantidades que são eficazes para o objetivo desejado. Por exemplo, uma variante C242 ou um conjugado da mesma pode ser combinado com um agente coterapêutico, tal como, agente quimioterápico.

Os ingredientes ativos também podem ser capturadas em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsula de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármaco coloidal (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition. Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a serem usadas para administração in vivo devem ser estéreis. Isto é prontamente executado pela filtração através de membranas de filtração estéreis, como discutido acima.

Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o antagonista, matrizes as quais estão na forma de artigos modelados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis [por exemplo, poli(2-hidroxi-*etil*-metacrilato), ou poli(vinilálcool)], polilactídeos (Patente U.S. Nº 3.773.919), co-polímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de etila, acetato de etileno vinil não-degradável, co-polímeros de ácido láctico ácido glicólico degradáveis, tais como o Lupron Depot™ (microesferas injetáveis compostas de co-polímero de ácido láctico ácido glicólico e acetato de leuprolída), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-*butírico*. Enquanto polímeros, tais como acetato de etileno vinil e ácido láctico ácido glicólico permitem a liberação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas de períodos do tempo menores. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo por um longo tempo, podem desnaturar ou agregar como resultado da exposição à umidade a 37°C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis modificações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser planejadas para

a estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é descoberto que é a formação de ligação S-S intermolecular através da permuta de tiodissulfeto, a estabilização pode ser alcançada pela modificação dos resíduos sulfidril, liofilização das soluções
5 acídicas, controle da umidade do conteúdo, uso de aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matriz de polímero específicas.

Métodos Terapêuticos de Uso

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de inibição da atividade do antígeno C242 pela administração de um anticorpo que antagoniza a função de anti-CD44/CanAg (antígeno), a um paciente
10 em necessidade do mesmo. Qualquer um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo da invenção, pode ser usado terapeuticamente.

15 Em uma modalidade preferencial, os anticorpos variantes ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou conjugado de um agente citotóxico e os anticorpos variantes ou epitopo dos mesmos de fragmentos de ligação da invenção estão usados para o tratamento de um distúrbio hiperproliferativa em um mamífero. Em modalidade mais preferencial, uma das
20 composições farmacêuticas descrita acima, e a qual contém um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo da invenção, é usada para o tratamento de um distúrbio hiperproliferativa em um mamífero. Preferencialmente, a distúrbio é câncer do
25 pulmão, mama, cólon, próstata, rim, pâncreas, ovário, cérvix e órgãos linfáticos, osteossarcoma, carcinoma sinovial, um sarcoma ou uma carcinoma em que CanAg está expresso, e outros cânceres ainda para ser determinados no quais CanAg é predominantemente expresso. Em outra modalidade, dita que a composição farmacêutica refere-se a outros distúrbios tais como,
30 por exemplo, doenças autoimunes, tais como lupus sistêmico, artrite reumatóide, e esclerose múltipla; as rejeições a enxerto, tais como rejeição a transplante renal, rejeição a transplante de fígado, rejeição a transplante de

pulmão, rejeição a transplante cardíaco, e rejeição a transplante de medula óssea; doença do enxerto contra o hospedeiro; infecções virais, tais como infecção por mV, infecção por HIV, AIDS, etc.; e infecções parasitárias, tais como giardíase, amebíase, esquistossomose, e outras como determinadas por um versado na técnica ordinária.

5 Similarmente, a presente invenção fornece um método para inibição do crescimento de populações celulares selecionadas compreendendo células contatantes com alvo, ou tecido contendo células alvo que expressam CanAg, com uma quantidade eficaz de um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo da presente invenção, ou agente terapêutico compreendendo um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e um anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo, sozinhos ou em combinação com outros agentes citotóxicos ou terapêuticos.

10 O método para inibição do crescimento de populações celulares selecionadas pode ser praticado in vitro, in vivo, ou ex vivo. Como usado neste pedido, "inibição do crescimento" significa reduzir a velocidade do crescimento de uma célula, reduzindo viabilidade celular, causando a morte de uma célula, lisar uma célula e induzir morte celular, ao longo de um curto ou longo período de tempo.

Exemplos de usos in vitro incluem tratamentos de medula óssea autóloga antes do seu transplante no mesmo paciente a fim de matar células doentes ou malignas; tratamentos da medula óssea antes do seu transplante a fim de matar células T competentes e prevenir a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD); tratamentos das culturas celulares a fim de matar todas as células exceto as variantes desejadas que não expressam o antígeno alvo; ou matar variantes que expressam antígeno indesejado.

30 As condições de uso in vitro não-clínico são prontamente determinadas por um versado na técnica.

[166] Exemplos de uso clínicos ex vivo são para remover células

tumorais ou células linfóides da medula óssea antes do transplante autólogo no tratamento de câncer ou no tratamento de doença autoimune, ou para remover células T e outras células linfóides da medula óssea ou tecido autólogo ou allogeneico antes do transplante a fim de prevenir a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD). O tratamento pode ser realizado como se segue. A medula óssea é coletada do paciente ou de outro indivíduo e então incubada em meio contendo soro ao qual é adicionado o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo da invenção. Faixas de concentração de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas em aproximadamente 37°C. As condições exatas da concentração e o tempo da incubação, isto é, a dose, são prontamente determinadas por um versado na técnica. Após a incubação, as células de medula óssea são lavadas com meio contendo soro e devolvidas ao paciente pela infusão i.v. de acordo com métodos conhecidos. Em circunstâncias onde o paciente recebe outro tratamento, tal como um curso de quimioterapia ablativa ou irradiação do corpo total entre o tempo de coleta do tutano e a reinfusão das células tratadas, as células de tutano tratadas são armazenadas congeladas em nitrogênio líquido usando equipamento médico padrão.

Para uso clínico in vivo, o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do mesmo ou um conjugado de um agente citotóxico e o anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo da invenção serão fornecidos como soluções que são testadas para esterilidade e para níveis de endotoxina. Exemplos de protocolos adequados de administração de conjugado citotóxico são como se segue. Conjugados são dados semanalmente durante 4 semanas como um bolo i.v. cada semana. Doses em bolus são dadas em 50 a 100 ml da solução salina normal à qual 5 a 10 ml da albumina sérica humana podem ser adicionados. As dosagens serão 10 μ g a 1 g por administração, i.v. (faixa de 100 ng a 10 mg/kg por dia). Mais preferencialmente, as dosagens variarão de 50 μ g a 30 mg. Ainda mais preferencialmente, as dosagens variarão de 1 mg a 20 mg. Após quatro semanas de

tratamento, o paciente pode continuar a receber tratamento segundo uma base semanal. Protocolos clínicos específicos quanto a via de administração, excipientes, diluentes, dosagens, tempos, etc. podem ser determinados por um versado na técnica como as garantias da situação clínica.

5 Diagnóstico

Os anticorpos ou os fragmentos de anticorpo da invenção também podem ser usados para detectar o antígeno C242(anti-CD44/CanAg) em uma amostra biológica in vitro ou in vivo. Em uma modalidade, os anticorpos C242 variantes da invenção são usados para determinar o nível de anti-CD44/CanAg em um tecido ou em células derivadas do tecido. Em uma modalidade preferencial, o tecido é um tecido doente. Em uma modalidade preferencial do método, o tecido é um tumor ou uma biópsia do mesmo. Em uma modalidade preferencial do método, um tecido ou uma biópsia do mesmo é primeiro excisada de um paciente, e os níveis de anti-CD44/CanAg no tecido ou biópsia podem então ser determinados em um imunoenensaio com os anticorpos ou fragmentos de anticorpo da invenção. O tecido ou biópsia do mesmo pode ser congelado ou fixado. O mesmo método pode ser usado para determinar outras propriedades do anti-CD44/CanAg, tais como sua modificação pós-traducional (por exemplo, glicolação), níveis de superfície celular, ou localização celular.

O método descrito acima pode ser usado para diagnosticar um câncer em um indivíduo que se sabe ou se suspeita ter câncer, em que o nível de CanAg medido no dito paciente é comparado com aquele de um indivíduo normal referência ou padrão. O dito método pode então ser usado para determinar se um tumor expressa CanAg, que pode sugerir que o tumor responderá bem ao tratamento com os anticorpos, fragmentos de anticorpo ou conjugados de anticorpo da presente invenção. Preferencialmente, o tumor é um câncer do pulmão, mama, cólon, próstata, rim, pâncreas, ovário, cérvix e órgãos linfáticos, osteossarcoma, carcinoma sinovial, um sarcoma ou um carcinoma em que CanAg está expresso, e outros cânceres ainda para serem determinados nos quais CanAg é predominantemente expresso.

A presente invenção fornece ainda para anticorpos monoclonais

variantes, anticorpos variantes humanizados e fragmentos de ligação a epitopo dos mesmos que são ainda marcados para uso em pesquisa ou aplicações diagnósticas. Em modalidades preferenciais, o marcador é um radiomarcador, um fluoróforo, um cromóforo, um agente de visualização ou um íon metálico.

Um método do diagnóstico é também fornecido no qual os ditos anticorpos marcados ou de fragmentos de ligação a epitopo dos mesmos são administrados a um indivíduo suspeitando ter câncer, e a distribuição do marcador no corpo do indivíduo é medida ou monitorada.

10 Conjunto

A presente invenção também inclui conjuntos, por exemplo, compreendendo um conjugado citotóxico descrito e instruções para uso do conjugado citotóxico para morte de tipos particulares de célula. As instruções podem incluir instruções para uso dos conjugados citotóxicos in vitro, in vivo ou ex vivo.

Tipicamente, o conjunto terá um compartimento contendo o conjugado citotóxico. O conjugado citotóxico pode estar em uma forma liofilizada, forma líquida, ou outra forma modificável para ser incluída em um conjunto. O conjunto pode também conter elementos adicionais necessários a prática do método descrito nas instruções no conjunto, tais como uma solução esterilizada para reconstituição de um pó liofilizado, agentes adicionais para combinação com o conjugado citotóxico antes da administração a um paciente, e instrumentos que ajudam na administração do conjugado a um paciente.

25 Desenho da sequência consenso

As sequências consenso foram criadas pela marcação dos resíduos presentes de cada posição no banco de dados de sequência de anticorpo murino de Kabat. Vários milhares de sequências da região variável da cadeia leve e pesada foram alinhadas com o módulo ClustalW na análise de sequência e programa de manipulação de dados "Vector NTI" (um produto da Invitrogen Corp.). Vide também Lu G, Moriyama EN Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. Brief Bioinform. 2004

Dec;5(4):378-88. O alinhamento foi importado para uma planilha do Microsoft Excel para calcular que resíduos foram mais frequentemente encontrados em cada posição nos bancos de dados da região variável da cadeia leve e pesada murino e então emitiu os resultados como sequências "consenso".

5 Em ocasião, consenso poderia ser dividido entre dois resíduos de aminoácido, em que o menor de dois aminoácidos conservados é escolhido para melhorar as propriedades biofísicas ou considerações de humanização de um anticorpo. Por exemplo, no caso imediato, na cadeia leve Q45 é substituída pelo R que não substitui o resíduo não-consenso com o resíduo consenso

10 murino, que é K. Tais observações são evidentes para um versado na técnica sem experimentação indevida ou necessitando destes detalhes específicos.

O banco de dados de sequência Kabat está comercialmente disponível através da compra de uma licença. Além disso, milhares de sequências de anticorpo murino estão publicamente disponíveis para baixar no sítio eletrônico do NCBI e podem ser usados para gerar dados similares.

15

Todas as referências citadas neste pedido e nos exemplos que seguem são expressamente incorporadas por referência em sua plenitude.

O amplo escopo desta invenção é melhor entendido com referência aos seguintes exemplos, que não são destinados a limitar a invenção a modalidades específicas.

20

EXEMPLOS

Materiais

Os preps de plasmídeo pSynC242 e controle foram preparados por técnicas de purificação padrão com CsCl₂. QuikChange Site-Directed Mutagenesis System foi obtido de Stratagene(#200518). RNeasy Mini Kit foi encomendado da Qiagen (#74104). Superscript First Strand Synthesis para reações de transcriptase reversa foi de GibcoBRL(#11904-418). Cyber Green real time PCR Master Mix foi obtida de Applied Biosystems (#4309155).

25

30 Estreptavidina conjugada fluoresceína foi de Jackson Immuno Research (#016-010-084 Img/ml). Placas com fundo em U de 96 cavidades foram da FALCON (#3077). EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin foi da Pierce (#21335).

Métodos

Substituição de aminoácido nas estruturas HC e LC de huC242 por mutagênese sítio-dirigida

Desenho do Iniciador

5 Pares de iniciadores para PCR complementares para reações de mutagênese eram em tamanho de 30 bases e continham a substituição de nucleotídeo(s) desejada no meio dos iniciadores. Purificou-se iniciadores em PAGE e foram reconstituídos em 150 ng/ μ l.

Reações de Mutagênese por PCR

10 Reações de PCR foram preparadas como se segue: 5 μ l de tampão de reação 10 vezes (Stratagene), 20 ng dsDNA molde, 0,85 μ l (125 ng) de iniciador reverso, 1 μ l de dNTP 400 mM (Stratagene), e ddH₂O foram adicionados a um volume final de 50 μ l em um tubo epindorf de parede fina. Finalmente, 1 μ l de Pfu Turbo DNA polimerase (2,5 U/ μ l, Stratagene) foi adicionado à mistura de reação e os tubos foram colocados em um termociclador MJ Research. As condições das reações foram como se segue:

1 ciclo em 95°C por 30 segundos

12 ciclos de 95°C por 30 segundos, seguidos por 55°C por 1 minuto, e 68°C por 11 minutos (1 minuto/kb com um molde de 11kb). O número de ciclos foi aumentado para 14 quando duas bases foram modificadas.

1 ciclo a 68°C por 8 minutos

Mantido a 4°C

Transformação de células competentes foi realizada como se segue:

25 O molde de DNA da PCR foi neutralizado por digestão com enzima de restrição de dependente de metilação, Dpn1 (Stratagene). A digestão por restrição foi realizada com 1 μ l de Dpn1 adicionada diretamente à reação de PCR e incubada a 27°C durante 1 hora. A reação foi então transformada pela adição de 3 μ l do produto de PCR digerido por Dpn1 a 50 μ l de células competentes XL-1 (Stratagene), incubação em gelo durante 30 minutos, seguidos por um pulso de calor de 42°C por 45 segundos, retornando ao gelo durante 2 minutos, e então adicionando 0,5 ml de tampão

SOC para uma incubação final a 37°C por 1 hora em agitação a 225 RPM. As células transformadas foram plaqueadas em placas LB/Amp (300 µl por placa) e incubadas a 37°C durante a noite.

Confirmação da mutagênese

5 O plasmídeo de DNA foi isolado a partir das colônias transformadas com colunas Qiagen mini prep e separadas por eletroforese em gel de agarose. Plasmídeos que mantiveram a mesma mobilidade eletroforética que o DNA molde foram ainda analisados por sequenciamento das regiões VH e VL a fim de confirmar os produtos de mutagênese esperados. Reações
10 de sequenciamento foram realizadas por técnicas de sequenciamento automático padrão (Sterky F, Lundeberg J Sequence analysis of genes and genomes. J Biotechnol. 2000 Jan 7;76(1):1-31).

Transfecções transientes

Transfecção transiente com plasmídeos de expressão de anticorpo foram realizadas com Qiagen's Superfection reagent Kit. Para assegurar a equivalência de transfecção entre os plasmídeos testados, as concentrações de DNA foram medidas pela OD260 e confirmadas pela visualização em um gel de agarose. Antes de transfecção, 3 x 10⁵ células 293T foram
15 plaqueadas em 6 discos de cavidades. Misturas de transfecção foram feitas até 0,6 ml por cavidade com 2 µg de plasmídeo de DNA (ou TE para o branco controle), misturadas com 15 µl de Superfect (Qiagen) e incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. A mistura foi adicionada as células 293T que foram então colocadas em uma incubadora a 37°C, CO₂ 5% por 2
20 horas. Após, as células foram lavadas com meio de cultura celular e finalmente incubadas em 1 mL do meio de cultura por 0h, 14 h, 22 h e 48 h em uma incubadora a 37°C, CO₂ 5% para permitir a produção de anticorpo. Os anticorpos secretados foram coletados do meio de cultura a 0 h, de 14 h, de 22 h e de 48 h após transfecção. A concentração de anticorpo foi medida por
25 ELISA quantitativa anti-hulgGl (QE).

30 Quantitativo do ELISA

Quantitativo do ELISA foi realizado em placas de 96 cavidades cobertas com um anticorpo IgG anti-ovelha humano (The Binding Site Limi-

ted, UK, product code AU0006) por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então bloqueadas com 1% de soro neonatal de cabra em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Os sobrenadantes de transfecção foram diluídos em série e aplicados às placas bloqueadas seguido por outra incubação à temperatura ambiente por 1 h. As placas do ELISA foram então lavadas 4 vezes com PBS./0,05% Tween-20, anticorpo secundário foi adicionado (anticorpo anti-humano Kappa conjugado a peroxidase (The Binding Site Limited, UK, product code APO 15), e as placas foram novamente incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS./0,05% de Tween-20 e ABTS foi adicionado (ABTS 0,5 mg/ml, H₂O₂ 0,03% em tampão citrato 0,1 M). A absorvância da placa de ELISA foi lida em OD₄₀₅ e a concentração de IgG1 humana foi calculada em relação à absorvância dos padrões internos.

15 Comparação quantitativa de mRNA e níveis intracelulares HC/LC do huC242 original e mutado

Isolamento de RNA total

RNA total foi isolado a partir de 6×10^6 células 293T transfectadas transientemente com Qiagen RNeasy spin columns seguindo os protocolos do conjunto. As células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, peletadas, o sobrenadante foi removido e os péletes foram congelados a -80°C durante a noite. Os péletes celulares foram partidos em 500 μl de tampão RLT contendo β -mercaptoetanol 1% (v/v), misturado completamente, e então homogeneizado por passagem por uma agulha de 20 gauge 5 vezes. A cada homogeneizado, 500 μl de etanol 70% foi adicionado, o tubo foi misturado, então 700 μl da amostra foram aplicados em uma mini coluna RNeasy, e os tubos foram girados em 10.000 rpm por 15 segundos. O fluxo contínuo foi descartado e a coluna foi lavada com 350 μl de tampão RW1 seguida por outro giro a 10.000 rpm por 15 segundos. O DNA celular foi removido com 80 μl de solução de DNase I (10 μl de DNase I em 70 μl de Tampão RDD) adicionado ao centro da membrana da coluna, incubada à temperatura ambiente (20 a 30°C) por 15 min, então 350 μl do Tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram girados a 10.000 rpm por 15 segundos. O

fluxo contínuo foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 ml para duas lavagens adicionais com 500 µl de Tampão RPE cada e girada a 10.000 rpm por 15 segundos para primeira lavagem e 2 minutos para a segunda lavagem. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 ml e girada a velocidade total por 1 minuto para secar completamente a coluna. Finalmente, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 ml e o RNA foi eluído com 30 µl água livre de RNase e girado a 10.000 rpm por 1 minuto. A concentração de RNA foi medida por OD260 e então as amostras foram armazenadas em -80°C.

10 Síntese de cDNA

As reações de síntese de cDNA de fita foram realizadas com transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen), seguindo os protocolos do conjunto. A mistura de reação foi feita com 3 µg de RNA total, 3 µL de hexâmeros randômicos, 1 µL de dNTP 10 mM, e completado a 10 µl com água tratada com DEPC. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos, e então posta no gelo por pelo menos 1 minuto. A cada reação, 2 µl de tampão RT 10x, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µl de inibidor de ribonuclease RNaseOUT foram adicionados, misturados, e incubados a 25°C por 2 minutos. Após, 1 µl de transcriptase reversa Superscript II (50U) foi adicionado a cada tubo, misturado e incubado por 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e então resfriado no gelo. A reação foi coletada por um giro breve e o RNA foi removido com RNase H (1 µl adicionado a cada tubo e incubado a 37°C por 20 minutos) antes de prosseguir com a PCR quantitativa.

25 Estrutura da PCR quantitativa

As reações de PCR quantitativas foram realizadas em placas 96 cavidades usando o Cyber Green Real Time PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems). As reações de transcriptase reversa foram diluídas 1:500 e 10 µl de cada amostra foram plaqueadas em triplicata nas cavidades. Para cada par de iniciador, uma curva padrão (4 a 5 pontos) foi gerada usando 10 µl de diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 de uma amostra de RNA. Controles internos de transfecção foram também realizados em triplicata pa-

ra cada amostra com iniciadores específicos para o gene de resistência a neomicina presente em cada plasmídeo. Um controle de número de célula separado também foi realizado para cada amostra usando iniciadores específicos para actina. A cada cavidade experimental e controle, 15 μl da mistura de reação (0,05 μl de cada iniciador 100 μM , 12,5 μl de 2x Cyber Green Real Time PCR Master Mix e 2,4 μl de ddH₂O) foram adicionados. As placas foram seladas e giradas para coletar os conteúdos antes de serem colocadas no termociclador em tempo real ABI prism 7000. As reações foram realizadas a 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados de reação foram analisados com o programa ABI prism 7000.

Análise dos níveis intracelulares das cadeias pesada e leve

Células expressando IgGs estavelmente ou transientemente foram lisadas em tampão RIPA e as concentrações de proteína foram normalizadas. Os lisados celulares foram submetidos a eletroforese sob condições desnaturantes ou não-desnaturantes. As IgGs nos lisados foram purificadas ou concentradas por técnicas de precipitação em Proteína A antes da eletroforese como necessário. Os géis de acrilamida foram analisados por técnicas de Western blotting usando anticorpos anti-IgG humana e anti-LCk humano para visualizar as bandas da cadeia pesada e da cadeia leve, respectivamente.

Medição da afinidade de ligação HuC242 a células positivas para o antígeno

Ligação não-competitiva

Os anticorpos huC242 e o variante foram normalizados para 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ com tampão de FACS (NGS 2,5% em meio RPMI). Amostras de 50 μl em duplicatas foram aplicadas em uma placa de 96 cavidades e diluídas em série 1:1 em tampão de FACS. Células Colo205 foram ressuspensas no tampão de FACS a 4×10^6 células/ml e 50 μl foram adicionados a cada cavidade. A placa foi incubada por 2 horas e então lavada 2 vezes com 200 μl de tampão de FACS por cavidade seguido por giro a 4°C por 5 minutos em 1200 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e 50 μl do anticorpo secundário marcado com FITC (1:100 diluído em tampão de FACS) foram adicio-

nados a cada cavidade e a placa foi incubada a 4°C por 30 minutos. Finalmente, a placa foi lavada como descrito acima e as células foram fixadas com 200 µl/cavidade de Formaldeído 1% em PBS. A ligação de anticorpo relativa às células alvo foi analisada pela fluorescência em um citômetro de

5

Ligação competitiva

HuC242 foi biotinizada com 1 mg/ml de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce #21335) incubado à temperatura ambiente por 1 hora. A reação foi parada com taurina e então dialisada contra PBS 1x a 4°C durante a

10

noite. O huC242 biotinizado foi diluído a $1,6 \times 10^{-9}$ M para uma concentração de reação final em 4×10^{-10} M.

O huC242 não marcado e os anticorpos variantes foram diluído em série 1:2 de 4×10^{-8} M a 1×10^{-11} M e 50 µl de cada amostra foram adicionados à placa. Após, 50 µl por cavidade de huC242 biotinizado foram misturados por pipetagem de cima para baixo 3 vezes. As células Colo 205 foram lavadas duas vezes com o tampão de FACS, ressuspensas a 2×10^5 células/ml, e 100 µl foram misturados em cada cavidade contendo as misturas de anticorpo. A placa foi incubada em gelo por 2 horas, lavadas 2 vezes com o tampão de FACS e então 50 µl Estreptavidina Conjugada a Fluoresceína diluída 1:100 foram adicionados. Após, a placa foi incubada em gelo por 1 hora, lavadas 2 vezes com o tampão de FACS e as células foram fixadas com 200 µl por cavidade de formaldeído 1% em PBS. A ligação competitiva foi analisada em um citômetro de fluxo BD FACScalliber.

15

20

Baixa de produção de huC242 é observada dentro de horas após transfecção transiente de células 293T.

25

Transfecções transientes foram realizadas em células 293T para comparar a expressão de huC242 com anticorpos de controle conhecidos terem moderados a altos potenciais de expressão. Plasmídeos que codificam os dois anticorpos humanizados de controle, bem como huC242 foram

30

transfectados em células 293T em paralelo e anticorpos segregados foram coletados do meio de cultura 0 h, 14 h, 22 h e 48 h após a transfecção. Logo quatorze horas após transfecção, o huC242 foi secretado muito menor do

que os anticorpos controle (Figura 2), e a diferença aumentou além do tempo. Em 48 horas, o huC242 acumulado produzido foi somente aproximadamente 7% do Controle A e 12% do Controle B.

Os níveis RNAm das cadeias pesada e leve de huC242 transfeções transitentes em 293T parecem normais

A fim de examinar se a baixa produção de huC242 é devida a baixos níveis de RNA mensageiro para IgG, os mRNAs das cadeias pesada e leve de huC242 foi comparado com outros anticorpos humanizados no repertório da ImmunoGen. HuC242 e os anticorpos de controles foram transfectados em células 293T em paralelo e mRNAs foram isolados a partir das células após 72 h. As amostras foram analisadas por técnicas de RT-PCR quantitativa e os resultados (Figura 3) indicam que os níveis de RNAm de huC242 são comparáveis aos anticorpos controles. O RNAm da cadeia pesada de huC242 normalizado foi um tanto maior que a maioria dos anticorpos, mas foi similar ao controle C. O RNAm da cadeia leve de huC242 foi menor que aquele do controle A, mas similar aos controles A e C. Tomados em conjunto, os níveis celulares de RNAm das cadeias pesada e leve de huC242 foi encontrado ser comparáveis com vários outros anticorpos capazes de alta produtividade.

A proporção relativa de huC242 montado (H2L2) para HC (H) é significativamente menor que a razão huB4 em linhagens celulares CHO estáveis

Com base nos resultados de qPCR, a baixa produtividade de huC242 provavelmente é pós-transcricional. Para analisar os eventos pós-transcricionais, a expressão intracelular e a montagem dos peptídeos das cadeias pesada e leve foram comparadas entre o controle A e huC242. A linhagem celular CHO estável que expressa o controle A foi comparado com duas linhagens celulares CHO estáveis que expressam huC242. Lisados celulares totais foram submetidos à purificação em proteína A e as IgGs isoladas foram separadas em um gel não-desnaturante e coradas com Coomassie Blue (Figura 4). A presença de múltiplas espécies de montagem incompleta de huC242 comparadas com o anticorpo de controle sugere que a montagem ineficiente das cadeias pesada e leve, possivelmente devido à

baixa compatibilidade entre os peptídeos ou suprimento insuficiente da cadeia leve, possa ser uma raiz da baixa expressão do anticorpo huC242.

Múltiplos resíduos de estrutura das cadeias pesada e leve de huC242 não se adequam às sequências consenso

5 A presença de resíduos não-consenso nas estruturas das cadeias pesada e leve de huC242 foi inicialmente realizada por alinhamento das sequências de aminoácido da região variável de huC242 com anticorpos controle com superfície recoberta conhecidos por ser capazes de alto nível de expressão em linhagens CHO estáveis. Uma vez que resíduos que levam à baixa expressão provavelmente não são prevalentes na natureza, as estruturas da região variável das cadeias pesada e leve de huC242 foram alinhadas as sequências consenso geradas a partir das entradas dos bancos de dados Kabat de IgG 1 murino e cadeia leve Kappa respectivamente (Figura 5). As sequências consenso murino foram utilizadas porque os resíduos inseridos na superfície recoberta do anticorpo, tal como huC242 conserva todos os resíduos murinos do anticorpo murino parental original e os resíduos de superfície humanos seriam não geralmente considerados para substituição. O resíduo 26(D), mostrado na Figura 5 é uma exceção àquele que é um resíduo inserido porque está exposto na superfície. Este resíduo foi substituído com G porque começar com ele (D) é um resíduo murino e como uma regra geral, os resíduos murinos podem ser substituídos mesmo que sejam encontrados fora dos resíduos inseridos. O resíduo G a partir do consenso murino, neste caso, sucede ser consistente com a sequência humana usada para a humanização de C242.

25 As mesmas posições de estrutura huC242 que não combinam com um pequeno grupo de anticorpos de recombinante também não combina com a sequência consenso do amplo banco de dados. Além disso, muitos destes resíduos de huC242 foram encontrados por serem extremamente raros nas mesmas posições no banco de dados Kabat, variando no presente em 16% de anticorpos murinos baixo para tão pouco como 0,80% (vide Tabela abaixo). Estes resíduos de estrutura inseridos raros foram escolhidos para investigação adicional em se algum contribui para o baixo potencial de

expressão do anticorpo huC242.

Tabela: Resíduos de aminoácidos raros na estrutura da região variável de huC242 e a frequência do seu aparecimento no banco de dados de anticorpo de Kabat. Para comparação, os resíduos de aminoácidos correspondentes da sequência consenso e sua frequência 1 é dada				
ESTRUTURA DA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA PESADA				
Resí- duo N°	huC242		Sequência consenso a partir de Kabat	
	Amino- ácido	Frequência em Kabat	Amino- ácido	Frequência em Kabat
16	E	95/3408: 2,8%	A	1533/3408: 45,6%
26	D	29/3661: 0,8%	G	3612/2661: 98,7%
46	K	88/3715: 2,4%	E	3563/3715: 95,9%
82A	K	17/3745: 0,45%	S	1953/3745: 52,1%
89	T	648/3894: 16,6%	V	2147/3894: 55,1%
ESTRUTURA DA REGIÃO VARIÁVEL DA CADEIA LEVE				
45	Q	244/2606: 9,4%	K/R	2307/2606: 88,5%
70	A	39/2987: 1,3%	D	1652/2987: 55,3%

Aumento moderado de produção de IgG por uma substituição DE aminoácido único em huC242 ou nas estruturas da cadeia leve.

5 Para investigar se os resíduos incomuns identificados nas estruturas das cadeias pesada e leve de huC242 podem impactar negativamente na produção de anticorpo, estes resíduos foram substituídos pelos resíduos consenso correspondentes usando mutagênese sítio dirigida. A expressão de anticorpo variante de aminoácido único de huC242 foi comparado a huC242 e anticorpo de controle por transfecção transiente. Os respectivos

10 plasmídeos de expressão foram transfectados em células 293T e após 72 horas, os níveis de IgGs secretados foram determinados por ELISA quantitativo. Aumentos moderados da produção de IgG foram alcançados por substituições de aminoácido único nas regiões de estrutura da cadeia pesada ou leve de huC242 (Figura 6).

15 Para assegurar que as substituições de resíduo não alteraram a atividade de ligação ao anticorpo, as variantes huC242 foram avaliadas por FACS em células Colo 205 antígeno positivas. Os resultados mostraram que

as substituições de aminoácido não modificaram o perfil de ligação (Figura 6).

Aumentos significantes na produtividade de anticorpo são alcançados pela combinação de duas a três modificações de resíduo na estrutura das cadeias pesada e leve de huC242

As substituições de aminoácido em huC242 foram estendidas para incluir múltiplas modificações de resíduo de estrutura. Os construtos das cadeias pesada e leve variantes também foram misturados e combinados para construir um arranjo de pares de variantes huC242, cada um contendo duas ou mais substituições de resíduo. As produtividades relativas das variantes de huC242 foram comparadas em transfecções transientes de 293T como descrito acima. As várias combinações de substituição de resíduos resultaram em diferentes níveis de produtividade, com os maiores aumentos vistos naquelas contendo duas ou três modificações combinadas entre a estrutura de região variável das cadeias pesada e leve de huC242 (Figura 7).

Os níveis de RNAm das cadeias pesada e leve de variantes huC242 permanecem inalterados.

O aumento na produtividade de huC242 vista com as variantes de sequências seriam devidas às propriedades melhoradas de transcrição, tradução ou pós-traducionais do anticorpo. Para investigar a fonte do aumento da expressão de huC242, um experimento de qPCR foi conduzido avaliando os níveis de RNAm de huC242 e das variantes de sequências huC242 expressas em células 293T transfectadas transientemente. Os resultados indicam que as variantes de huC242 produziram níveis similares de RNAm tanto da cadeia pesada como da leve quando comparada com huC242 (Figura 8). Isto sugere que o aumento da produção de anticorpo das variantes huC242 não foi devido ao aumento da transcrição ou estabilidade do RNAm, mas possivelmente devido às propriedades pós-transcricionais melhoradas.

Um aumento no peptídeo de cadeia leve intracelular é observado em consequência das variações de cadeia pesada

Para estudar ainda os mecanismos possíveis associados com a produtividade aumentada de huC242 pelas substituições de resíduo de estrutura da região variável, os níveis de peptídeo das cadeias pesada e leve intracelular foram comparados. O huC242 e as variantes de sequência foram
5 transientemente transfectadas em células 293T que foram lisadas 72 horas após, e os lisados celulares totais foram avaliados por técnicas de Western blotting sob condições desnaturantes. Tanto anticorpos secundários anti-huIgG 1 como anti-huK foram utilizados para visualizar ambas as bandas das cadeias pesada e leve no mesmo gel. De maneira interessante, as substitu-
10 tuições de resíduo na estrutura da região variável da cadeia pesada não afetaram a expressão de cadeia pesada mas sim aumentado o acúmulo intracelular da cadeia leve de huC242 não contendo substituições de resíduo (Figura 9). Estes resultados sugerem que as variantes da cadeia pesada de huC242 protegem a cadeia leve de huC242 de ser degradada, possivelmen-
15 te através do aumento da compatibilidade da cadeia pesada com a cadeia leve que leva a um aumento da montagem de anticorpo e enfim a produção de anticorpo aumentada. Estes resultados também mostraram que as produtividades das variantes huC242 foram aproximadamente proporcionais aos seus níveis de cadeia leve intracelular, mas não os de cadeia pesada.

20 As substituições de resíduo em huC242 levam à montagem melhorada das cadeias pesada e leve

Western blots realizados sob condições não-desnaturantes fornecem evidências adicionais de propriedades pós-traducionais melhoradas nas variantes de huC242. Lisados celulares totais a partir de células 293T
25 transfectadas transientemente com huC242 e os construtos variantes foram avaliados com técnicas de Western blotting não-desnaturantes (Figura 10). Nestes experimentos, os anticorpos totalmente montados não-desnaturados poderiam ser visualizados em conjunto com as cadeias leve e pesada não-montada bem como produtos de montagem intermediária. A proporção intra-
30 celular de IgG totalmente montada (H2L2) versus produtos de montagem intermediária (H2, H2L1, etc.) foi significativamente melhorada como um resultado das substituições de aminoácido (Figura 10(a)). Além disso, estes

resultados mostraram que quando as variantes das cadeias pesada e leve foram usadas em combinação, os níveis intracelulares de ambas as cadeias foram aumentados. Isto sugere que as interações melhoradas entre as sequências de variantes das cadeias pesada e leve resultam na proteção intracadeia mútua da degradação.

Os construtos e variantes de huC242 foram avaliados em géis corados com Coomassie Blue para evitar artefatos potenciais associados com as técnicas de Western blotting (Figura 10(b)). Os lisados celulares totais a partir das células 293T transientemente transfectadas foram submetidos a técnicas de purificação em Proteína A, então as IgGs isoladas foram aplicadas em PAGE não-desnaturante e posteriormente coradas com Coomassie Blue. Os resultados são consistentes com os observados por Western blot, demonstrando níveis significantes de anticorpo parcialmente montado na coluna huC242 e um aumento na proporção de anticorpo totalmente montado (H2L2) nas colunas de variante de huC242

As substituições de resíduo nas variantes de huC242 não afetam o atividade de ligação ao antígeno

A atividade de ligação relativa de huC242 e os construtos de variantes foram avaliados no células Colo205 antígeno positivas por FACS. As variantes de huC242 capazes aumentar a produtividade de anticorpo não exibiram modificações significantes no atividade de ligação a antígeno (Figura 11(a)). Para confirmação adicional destes resultados, um ensaio de ligação competitiva foi realizado pelo desafio de huC242 biotinilado ligado a células Colo205 com variantes de huC242 não marcadas serialmente diluídas (Figura 11 (b)). Este experimento demonstrou que as variantes de huC242 poderiam competir com huC242 pela ligação a células Colo205 antígeno positivas em uma maneira dependente da concentração. Os resultados combinados dos ensaios de ligação direta e competitiva indicam que huC242 e os construtos de variantes têm similares atividades de ligação.

Aqueles versados na técnica apreciarão que as condições e técnicas de re-engenharia, incluindo processos, com exceção daqueles que são especificamente ilustrados neste pedido podem ser empregadas na prática

desta invenção como reivindicado sem recurso à experimentação indevida. Aqueles versados na técnica reconhecerão e entenderão que equivalentes funcionais dos procedimentos, condições de processo, e técnicas ilustradas neste pedido existem na técnica. Todos esses equivalentes conhecidos são
5 destinados a ser englobados por esta invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> ZHOU, Xiao-Mai

TAVARES, Daniel

<120> MÉTODOS PARA MELHORAR A PRODUÇÃO DE ANTICORPO

5 <130> A9267

<150> US 60/855361

<151> 2006-10-31

<160> 16

<170> PatentIn versão 3.3

10 <210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

15 <223> huC242 cadeia pesada

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr

20 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Thr Thr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

25 Gln Gly Arg Ile Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Lys Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

30 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 5 <220>
 <223> huC242 cadeia leve
 <400> 2
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 10 Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 15 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His
 85 90 95
 20 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 <210> 3
 <211> 132
 <212> PRT
 25 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> sequência consensual de murino de cadeia pesada
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 30 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Asn Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Lys Ala Gly Asn Gly Gly Thr Lys Tyr
 50 55 60
 5 Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr
 10 100 105 110
 Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130
 15 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 20 <223> sequência consensual de murino de cadeia leve
 <400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 25 20 25 30
 Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 30 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95
 Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ser Thr His Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 100 105 110
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

5 115
 <210> 5
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

10 <220>
 <223> huC242 sequência de cadeia leve
 <400> 5
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

15 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Val Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
 35 40 45
 Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro

20 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Val Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
 85 90 95

25 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Leu Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys Arg

30 130
 <210> 6
 <211> 132

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> huMy96 sequência cadeia leve

5 <400> 6

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val

20 25 30

10 Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val

35 40 45

Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

15 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr

100 105 110

20 Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Ile Lys Arg

130

<210> 7

25 <211> 122

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> rB4 sequência cadeia leve

30 <400> 7

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Val Asn Tyr
35 40 45

5 Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Arg Arg Trp Ile
50 55 60

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro
10 85 90 95

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Gly Ser Tyr Thr Phe
100 105 110

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120

15 <210> 8
<211> 132
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>

20 <223> huEM164 sequência cadeia leve
<400> 8

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
25 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

30 Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95
 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 5 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130
 <210> 9
 <211> 132
 10 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> huN901 sequência cadeia leve
 <400> 9
 15 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 20 25 30
 Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile
 35 40 45
 20 Ile His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 25 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 30 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

- <210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
- 5 <220>
 <223> sequência de cadeia leve consensual
 <400> 10
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
- 10 Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Pro Gly Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Ile His Ser Asn Thr Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 15 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ser Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser
 85 90 95
- 20 Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Pro Thr Phe
 100 105 110
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120
- <210> 11
- 25 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> huC242 sequência de cadeia pesada
- 30 <400> 11
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe
35 40 45

5 Thr Tyr Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asp Thr Thr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ile Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
10 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Lys Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp
115 120 125

15 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
20 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

25 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
30 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

5 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

10 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

15 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

20 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

25 Ser Pro Gly Lys
465

<210> 12

<211> 1404

<212> DNA

30 <213> Sequência artificial

<220>

<223> huC242 sequência de cadeia pesada

<400> 12

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60

gtccagttgg tgcagtctgg agccgaggtg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctgattatac cttcacatac tatggaatga actgggtgaa gcaggctccg 180

5 ggacagggtc tgaagtggat gggctggatc gacaccacca ctggagagcc aacatagtct 240

cagaagttc agggacggat tgccttctct ttggagacct ctgccagcac tgcctatctg 300

cagatcaaaa gcctgaaatc tgaggacacc gctacatatt tctgtgccag acgggggcct 360

tacaactggt actttgatgt ctggggccag gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420

accaagggcc catcggcttt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480

10 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccggctg tcttacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaactc 720

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

15 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 840

acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg

960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

20 aagtgaagg tctccaacaa agcctccca gccccatcg agaaaacat ctcaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc

1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200

Page 10

25 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac

1260

tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380

agcctctccc tgtctccggg taaa 1404

30 <210> 13

<211> 238

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> huC242 sequência cadeia leve

<400> 13

5 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Val Pro Val
20 25 30
Thr Pro Gly Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
10 35 40 45
Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Val Ser
65 70 75 80
15 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
85 90 95
Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110
Leu Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu
20 115 120 125
Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
25 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
30 195 200 205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 14

<211> 714

5 <212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> huC242 sequência cadeia leve

<400> 14

10 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgat 60
 attgtgatga ctcaagtctcc actgtctgta cctgtcactc ctggagagcc tgtatccatc 120
 tcctgcaggt ctagtaagag tctcctgcat agtaatggca acacttactt gtattgggtc 180
 ctgcagagggc caggccagtc tcctcagctc ctgatatac ggatgtccaa cctgggtctca 240
 ggagtcccag acaggttcag tggcagtggg tcaggaactg cttcacact gagaatcagt 300
 15 agagtggagg ctgaggatgt ggggtttat tactgtctgc aacatctgga gtatccgttc 360
 acgttcggtc ctgggaccaa gctggagctg aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccg cactctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 20 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 714

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

25 <213> Sequência artificial

<220>

<223> huC242 sequência de domínio variável de cadeia pesada

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

30 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Thr Thr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 5 Gln Gly Arg Ile Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Lys Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 10 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 16
 <211> 113
 15 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> huC242 sequência de domínio variável de cadeia leve
 <400> 16
 20 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 25 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Arg

-

-

-

-

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a produção de um anticorpo murino humanizado ou um fragmento do mesmo em uma célula hospedeira pela reengenharia de sequência, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 a) alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura da região variável de anticorpo murino, em que tal alinhamento identifica os resíduos de aminoácidos mais frequentemente encontrados (resíduos consenso) em cada posição na dita estrutura;

10 b) comparação dos ditos resíduos consenso com os resíduos correspondentes na sequência da estrutura da região variável do anticorpo humanizado;

c) identificação no dito anticorpo humanizado de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso de na sequência da estrutura da região variável; e

15 d) substituição no dito anticorpo humanizado ou fragmento do mesmo de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso com o resíduo consenso na posição equivalente para produzir um anticorpo variante, em que o dito anticorpo variante é produzido na dita célula hospedeira em um rendimento maior quando comparado com o dito anticorpo humanizado;

20 e

e) opcionalmente, um ou mais de aminoácidos são substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito rendimento maior é pelo menos 2 vezes ou maior.

25 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é na dita cadeia pesada.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é na dita cadeia leve.

30 5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é em ambas as cadeias pesada e leve.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que a substituição é no núcleo da sequência da

estrutura da região variável.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 5, caracterizado pelo fato de que o aminoácido não-consenso é um aminoácido raro.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humanizado é huC242 e as substituições estão em uma ou mais posições da região variável da cadeia pesada selecionadas de 16, 26, 46, ou 89 na SEQ ID NO: 1 ou posições da região variável da cadeia leve 45 ou 70 na SEQ ID NO: 2, ou ambas, as posições que são determinadas pelo esquema de numeração de Kabat, e em que o aminoácido da sequência da região variável da cadeia leve é representado pela SEQ ID NO: 2 e a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada é representada pela SEQ ID NO: 1

15 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humanizado é huC242 e as substituições de um ou mais selecionados a partir do grupo composto de Q45K/R e A70D na cadeia leve, e um ou mais selecionados a partir do grupo composto de resíduos de aminoácidos E1A, D26G, K46E e T89V na cadeia pesada, o resíduo aminoácido que é determinado pelo esquema de numeração de resíduo de anticorpo Kabat, e em que a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve é representada pela SEQ ID NO: 2 e a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada é representado pela SEQ ID NO: 1.

25 10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humanizado é huC242 e as substituições são uma ou mais selecionadas a partir do grupo composto de Q45K/R e A70D na cadeia leve, o resíduo de aminoácido que é determinado pelo esquema de numeração de resíduo de anticorpo Kabat, e em que a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve é representada pela SEQ ID NO: 2.

30 11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humanizado é huC242 e as substituições são aquelas selecionadas a partir do grupo composto de resíduos de aminoácidos E1A, D26G, K46E, e T89V na cadeia pesada, o resíduo de aminoácido que

é determinado pelo esquema de numeração de resíduo de anticorpo Kabat, e em que a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada é representada pela SEQ ID NO:1.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humanizado é huC242 e as substituições são aquelas selecionadas a partir grupo composto de resíduos de aminoácidos E1A, D26G, K46E, T89V, K46E/D26G, K46E/K82S, K46E/T89V, K46E/E16A/D26G, K46E/K82S/D26G e K46E/T89V/D26G na cadeia pesada, o resíduo de aminoácido que é determinado pelo esquema de numeração de
10 resíduo de anticorpo Kabat, e em que a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada é representada pela SEQ ID NO: 1.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo humanizado é huC242 e as substituições são uma de A70D ou Q45K/R na cadeia leve e uma de K46E, D26G, K46E/D26G ou
15 K46E/T89V na cadeia pesada, o resíduo aminoácido que é determinado pelo esquema de numeração de resíduo de anticorpo Kabat, e em que a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve é representada pela SEQ ID NO: 2 e a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada é representada pela SEQ ID NO: 1.

20 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, caracterizado pelo fato de que o dito rendimento maior é de pelo menos 2 vezes ou maior.

15. Anticorpo, caracterizado pelo fato de ser produzido pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 8 a 13.

25 16. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência humana inteira que codifica C242 tendo pelo menos uma variação em uma região da dita sequência que codifica uma região variável da cadeia pesada ou uma região variável da cadeia leve, em que pelo menos uma dita variação aumenta o rendimento de uma proteína codificada
30 pelo dito gene C242 e em que a dita proteína inclui pelo menos uma dita variação.

17. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 16, caracteri-

zado pelo fato de que pelo menos uma dita variação compreende uma variação em uma região da dita sequência que codifica um motivo de aminoácido da região variável da cadeia pesada (Figura 12) ou uma região variável da cadeia leve (Figura 12) ou ambos.

5 18. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dita variação no dito motivo é selecionada a partir da substituição de um códon que codifica de Gln (CAG) para Lys (AAA) ou Arg (CGG), de um códon que codifica Ala (GCT) para Asp (GAT), de um códon que codifica Glu (GAG) para Ala (GCC), de um códon
10 que codifica Asp (GAC) para Gly (GGC), de um códon que codifica Lys (AAA) para Glu (GAA); ou de um códon que codifica Thr (ACC) para Val (GTC).

19. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dita substituição do dito códon ocorre em uma cadeia leve ou uma pesada.

15 20. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dita substituição da cadeia leve é selecionada a partir de:

Q45K/R Gln(CAG) para Lys(AAA) ou Arg(CG G) ou
A70D Ala(GCT) para Asp (GAT)

20 21. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dita substituição da cadeia pesada é selecionada a partir de

E16A Glu (GAG) para Ala (GCC);
D26G Asp (GAC) para Gly (GGC);
25 K46E Lys (AAA) para Glu (GAA); ou
T89W Thr(ACC) para Val (GTC)

22. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dita sequência codifica um produto gênico variante C242.

30 23. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dito produto gênico é um anticorpo.

24. Anticorpo variante ou fragmento de ligação a epitopo do

mesmo, caracterizado pelo fato de que a dita variante tem uma ou mais substituições de aminoácidos em um anticorpo parental que tem uma região variável que compreende uma cadeia pesada da SEQ ID NO: 1 [huC242] e uma cadeia leve da SEQ ID NO:2 [huC242] e a dita variante mostra uma síntese melhorada quando introduzida em uma célula hospedeira única quando comparada com o dito anticorpo parental.

25. Anticorpo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita substituição está em uma ou mais posições selecionadas a partir de 45 e 70, na dita SEQ ID NO:2 ou 16, 26, 46, ou 89 na dita SEQ ID NO:1, ditas posições sendo determinadas pelo esquema de numeração Kabat.

26. Anticorpo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é selecionada a partir do grupo composto de Q45K/R, A70D, E16A, D26G, K46E, ou T89V na cadeia pesada, ditas posições sendo determinadas pelo esquema de numeração Kabat.

27. Método para aumentar a produção de um anticorpo humanizado ou um fragmento de ligação a epitopo do mesmo em uma célula hospedeira pela re-engenharia da sequência, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura da região variável de anticorpo a partir de anticorpos do mesmo gênero ou outra classificação taxonômica como aquela da qual o anticorpo humanizado foi derivado pertence, em que tal alinhamento identifica os resíduos de aminoácidos mais frequentemente encontrados (resíduos consenso) em cada posição na estrutura;

b) comparação dos resíduos consenso com a sequência dos resíduos correspondentes na estrutura da região variável do anticorpo humanizado;

c) identificação no anticorpo humanizado de um ou mais resíduos não-consenso na sequência da estrutura da região variável; e

d) substituição no anticorpo humanizado ou um fragmento dito do mesmo de um ou mais resíduos não-consenso com o resíduo consenso

na posição equivalente para produzir um anticorpo variante, em que o anticorpo variante é produzido em uma célula com um rendimento maior quando comparado com o anticorpo humanizado.

5 e) Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

28. Método para aumentar a produção de um anticorpo parental ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo em uma célula hospedeira pela re-engenharia da sequência, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 a) alinhamento de uma coleção de sequências de estrutura da região variável de anticorpo a partir de anticorpos do mesmo gênero ou outra classificação taxonômica como aquela da qual o anticorpo parental foi derivado pertence, em que tal alinhamento identifica os resíduos de aminoácidos mais frequentemente encontrados (resíduos consenso) em cada posição na
15 estrutura;

b) comparação dos resíduos consenso com os resíduos correspondentes na sequência da estrutura da região variável do anticorpo parental;

20 c) identificação no anticorpo parental de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso na sequência da estrutura da região variável; e

d) substituição no anticorpo parental ou fragmento do mesmo de um ou mais resíduos de aminoácidos não-consenso com o resíduo consenso na posição equivalente para produzir um anticorpo variante, em que o anticorpo variante é produzido na célula hospedeira em um rendimento maior quando comparado com o anticorpo parental.
25

e) Opcionalmente, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo não-consenso por considerações biofísicas.

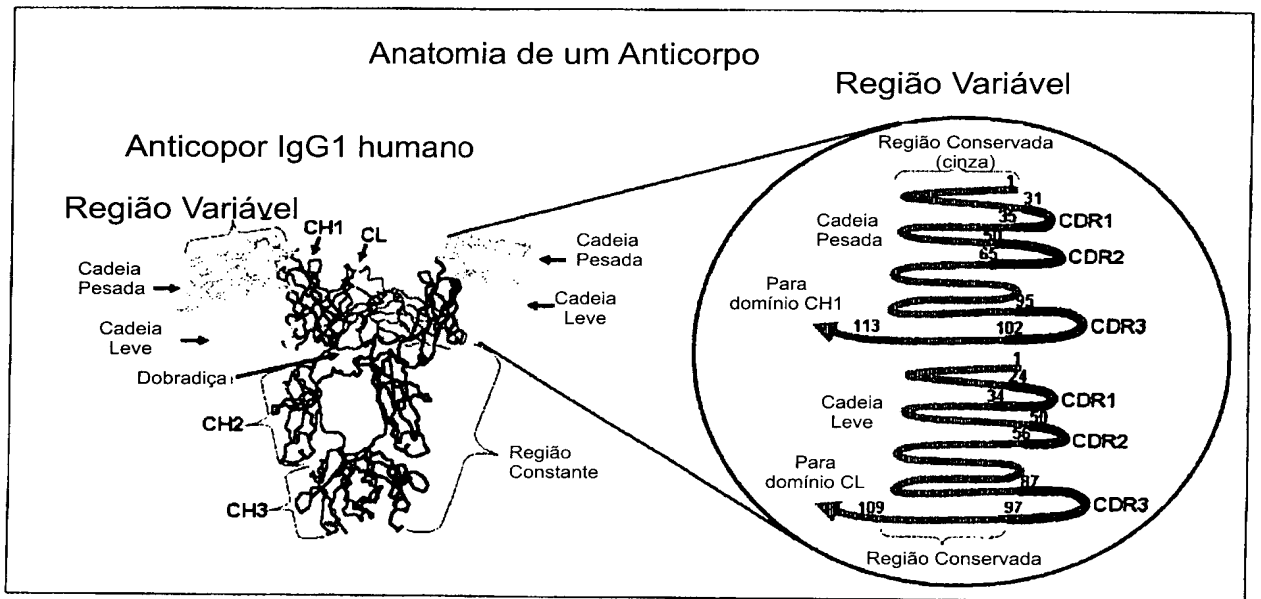


FIG. 1

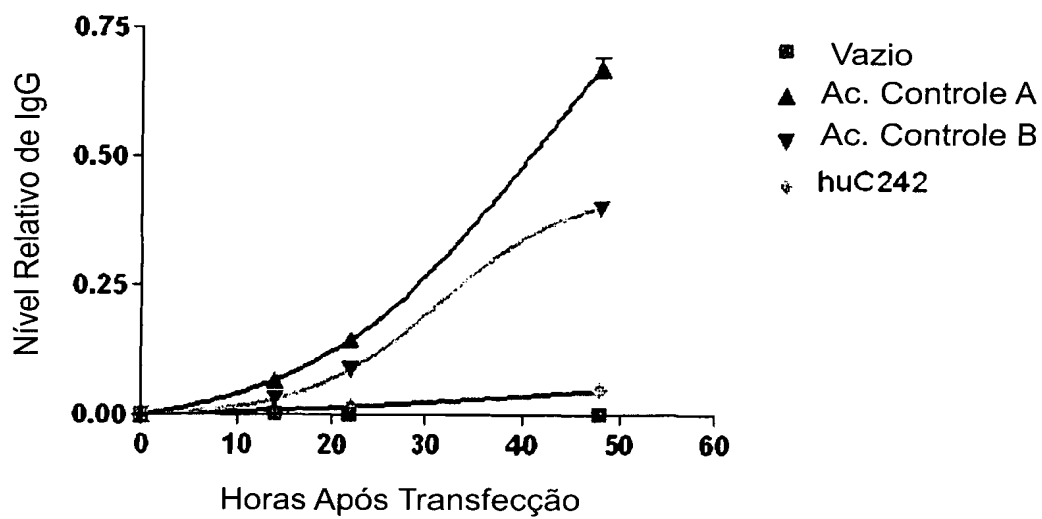
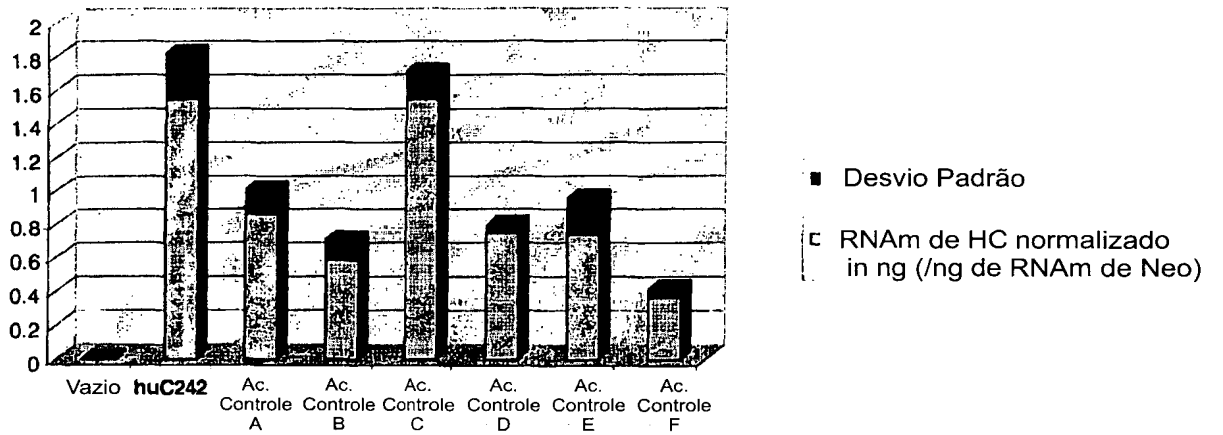


FIG. 2

RNA m de HC (normalizado pelo RNAm de neo)



RNA m de LC (normalizado pelo RNAm de neo)

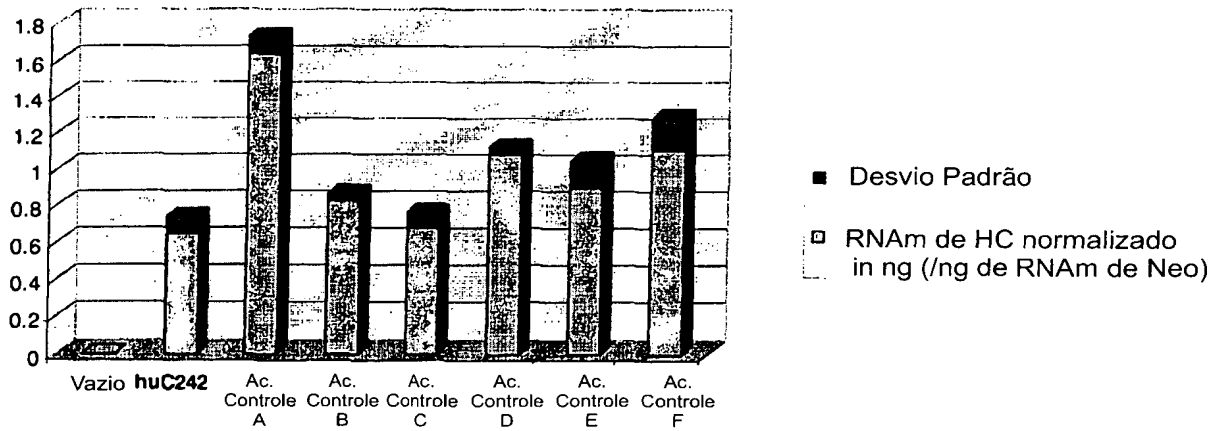


FIG. 3

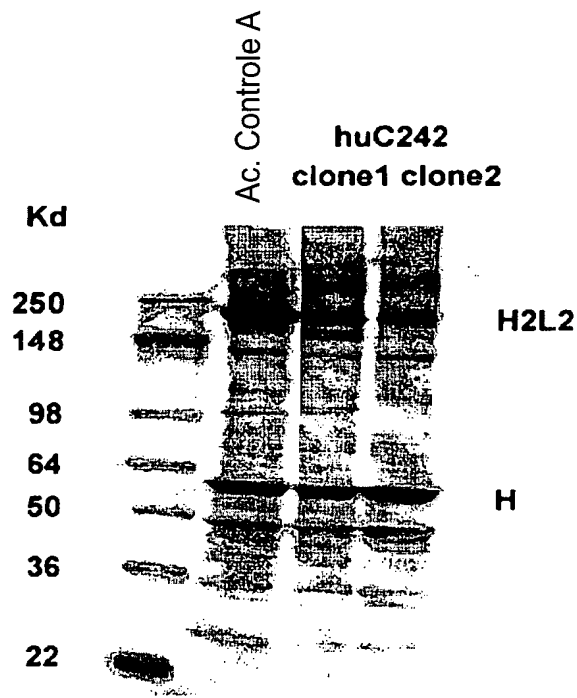


FIG. 4

5/20

FIG. 5a

A. Cadeia Pesada

```

      Kabat# 1          26      CDR1          46      CDR2          65
huC242 HC  QVQLVQSGAEVKKPGETVKISKASQYTTITFYGHEWUWKQAPGQGLRQMGWLDITFG--EFTYAQKFGG
cons. muHC  EVQLQQSGAELVKPQASVKLSCKASQYTTITSYWHHNSWUWKQRPQKGLRQIGYLRPKAGGGGKYNKIKKG
      * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *

      Kabat# 66          89      CDR3          113
huC242 HC  RIAFSLETASSTAYLQIKSLKSEDTAAYTCAREGPFY-----WYFDVGGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:1)
cons. muHC  KATLVQDKSSSTAYMQLSILTSEDSADAYTCARYFYFGGSPFYFYFYFYFDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:3)
      * *      * * *      * * *      * * *      * * *

```

FIG. 5b

B. Cadeia Leve

```

      Kabat# 1          45      CDR1          64
huC242 LC  DIVMTQSPVSPVTPGEPVSIICRSKSLKMS-NGHTTYLYWFLQRPQGSPDLLIYRHSMLVSGVDRFSG
cons. muLC  DIVMTQSPASLVSLGEKVTISCRASQSLLSHGNGSYLNWYQQKPGQSPDLLIYDTSNLASGVDRFSG
      * *      * *      * *      * * *      * * *      * * *

      Kabat# 65  70          CDR3          107
huC242 LC  SGSGTFTFLISRVEAEDVGVYYCLQHLRYP-----FTFGPGTKLELK (SEQ ID NO:2)
cons. muLC  SGSGTFTFLISSVEAEDAKTYCQWSSYPPSTHTPLTFGGGCKLEIK (SEQ ID NO:4)
      * *      * *      * *      * * *      * * *

```

FIG. 5c

C. Alinhamento das cadeias leves de cinco anticorpos humanizados

Cadeia Leve		CDR1	
		1	50
huC242 LC	(1)	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVETOSPLSLPVPSPGEPVVISCRSSKSEEH	
huMy96 LC	(1)	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVETOSPLSLPVPSPGEPVVISCRSSKSEEH	
rB4 LC	(1)	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVETOSPALSASPGERVVISCRSSKSEEH	
huEM164 LC	(1)	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVETOSPLSLPVPSPGEPVVISCRSSKSEEH	
huN901 LC	(1)	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVETOSPLSLPVPSPGEPVVISCRSSKSEEH	
Consenso	(1)	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVETOSPLSLPVPSPGEPVVISCRSSKSEEH	
		CDR1	CDR2
		Sítio de Restrição Kpn1	
		51	100
huC242 LC	(51)	SNG-NTYLYWYLOHPGQSPRLLIYKSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLRI	
huMy96 LC	(51)	SSQKNYLAHWYQKPGTSPRLLIYKSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLRI	
rB4 LC	(46)	SG--VNYLHWYQKPGTSPRLLIYKSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLRI	
huEM164 LC	(51)	SNG-NTYLYWYLOHPGQSPRLLIYKSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLRI	
huN901 LC	(51)	SDG-NTYLYWYLOHPGQSPRLLIYKSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLRI	
Consenso	(51)	S NTYL WYQKPGQSPRLLIYKSNR SGVPDRFSGSGGTDFTLRI	
		CDR3	
		101	133
huC242 LC	(100)	SRVEAEDLGIYYCLOHLEYRFTFGPGTKLEIKR	
huMy96 LC	(101)	SSVQPEDLGIYYCHQY-LSSRTFGQGTKLEIKR	
rB4 LC	(94)	SSVQPEDLGIYYCHQY--RGSYTFGGGTKLEIKR	
huEM164 LC	(100)	SRVEAEDLGIYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKR	
huN901 LC	(100)	SRVEAEDLGIYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKR	
Consenso	(101)	SRVEAEDLGIYYC Q P TFG GTKLEIKR	

FIG. 6

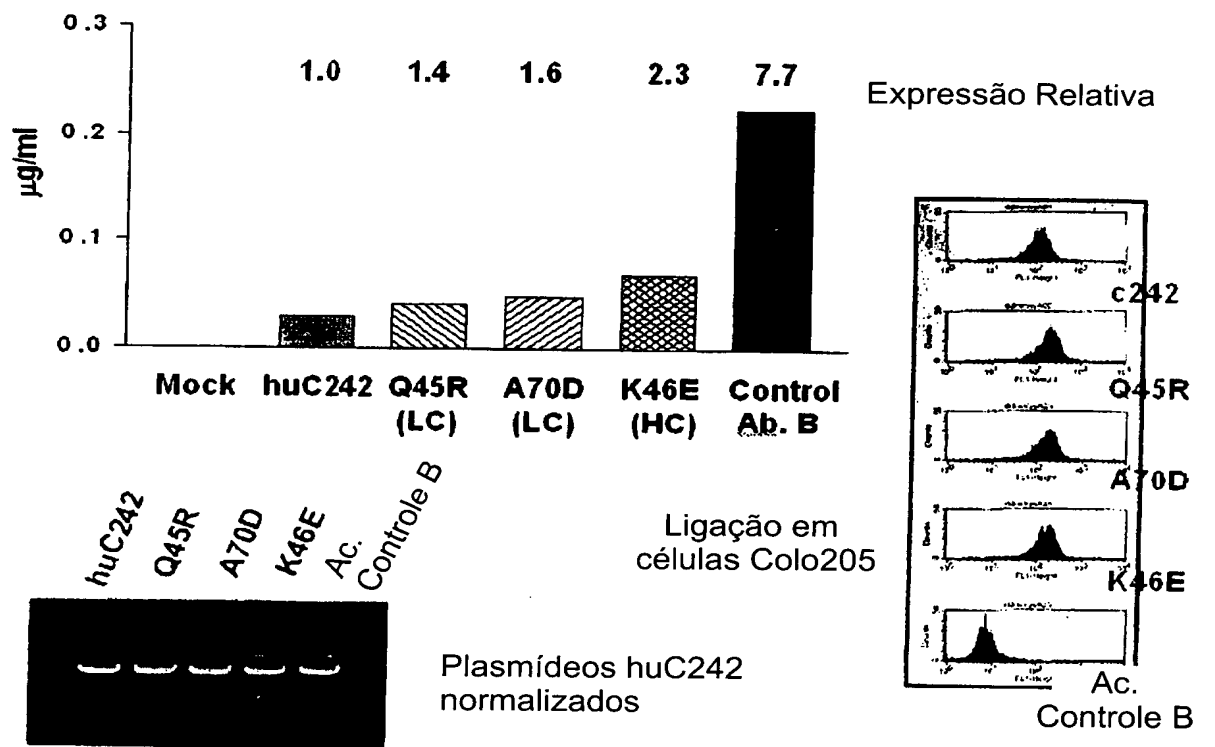


FIG. 7

	Substituição d e resíduo na LC	Substituição de resíduo na HC	Expressão relativa
huC242			1.0
huC242 Variante 1	Q45R		1.6
huC242 Variante 2	A70D		1.5
huC242			1.0
huC242 Variante 3		E16A	<1.0
huC242 Variante 4		D26G	2.2
huC242 Variante 5		K46E	2.5
huC242 Variante 6		K46E/D26G	3.9
huC242 Variante 7		K46E/K82S	3.5
huC242 Variante 8		K46E/T89V	3.1
huC242 Variante 9		K46E/E16A/D26G	3.5
huC242 Variante 10		K46E/K82S/D26G	4.1
huC242 Variante 11		K46E/T89V/D26G	4.3
huC242			1.0
huC242 Variante 12	A70D	K46E	4.3
huC242 Variante 13	A70D	D26G	4.7
huC242 Variante 14	A70D	K46E/D26G	6.2
huC242 Variante 15	A70D	K46E/T89V	3.8
huC242 Variante 16	Q45R	K46E	4.8
huC242 Variante 17	Q45R	D26G	6.5
huC242 Variante 18	Q45R	K46E/D26G	7.8
huC242 Variante 19	Q45R	K46E/T89V	4.5
Anticorpo Controle B			8.3

FIG. 8

Produtividade Relativa de IgG

□	Ac. Controle A	8.3
▨	huC242	1.0
■	huC242 Variante 18	7.8
■	huC242 Variante 13	4.7
▤	huC242 Variante 17	6.5
▥	huC242 Variante 13	4.5

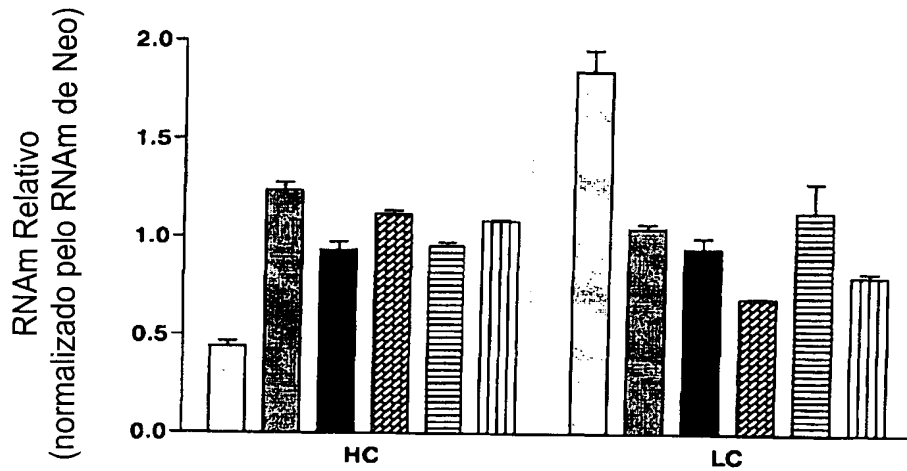


FIG. 9

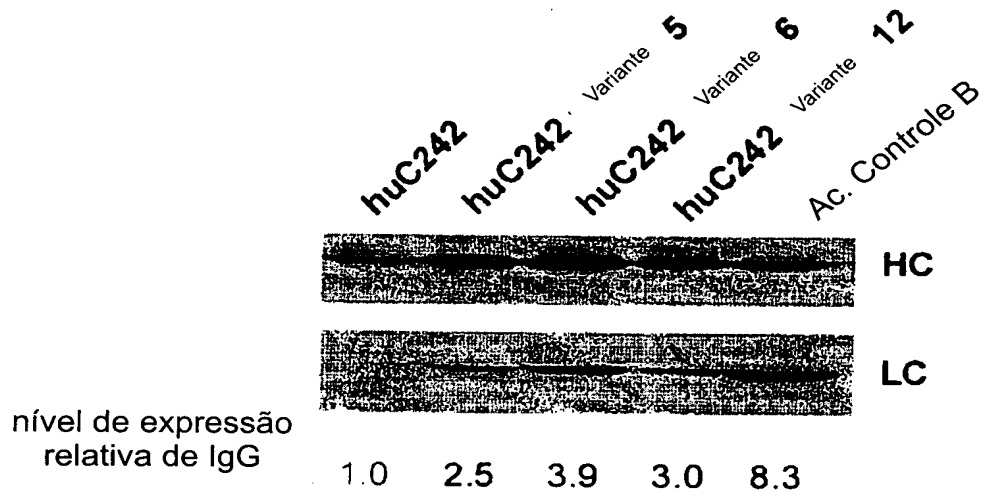
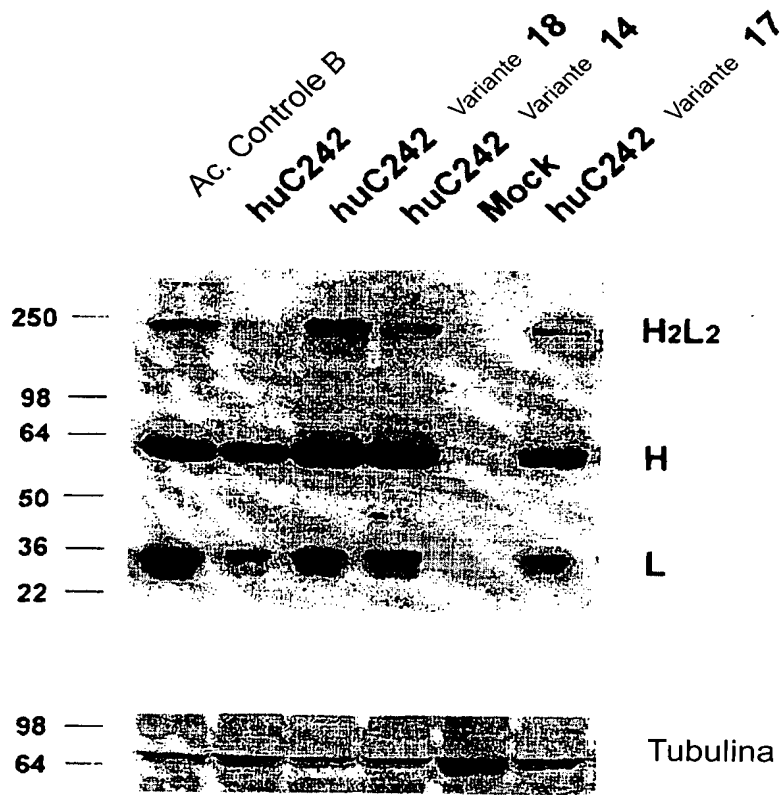


FIG. 10a



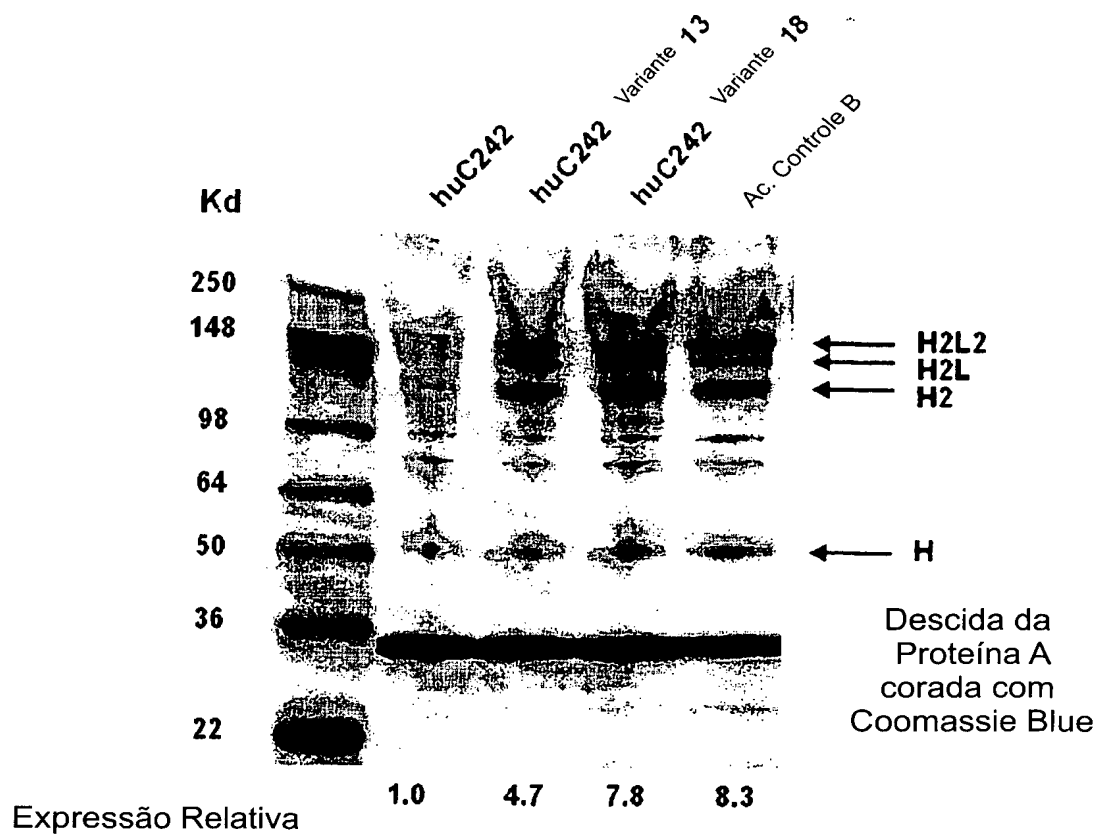
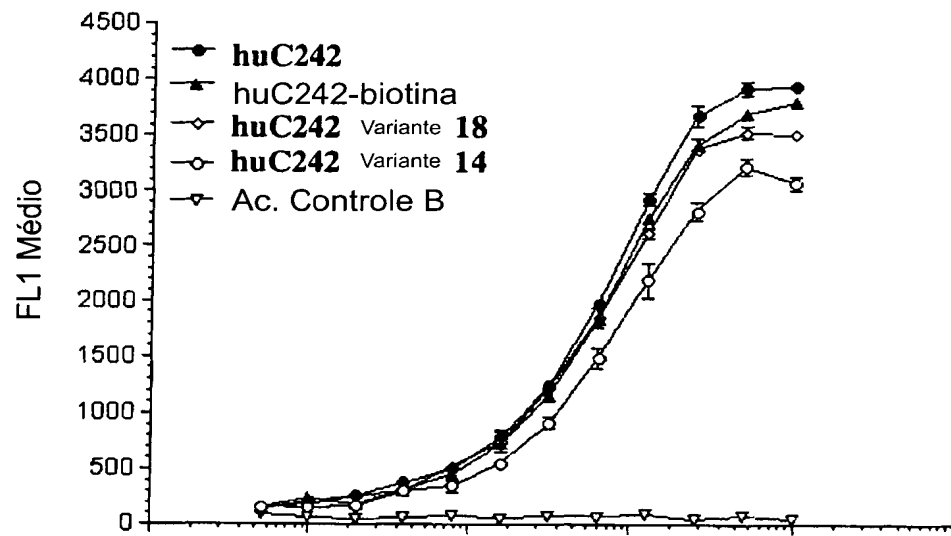


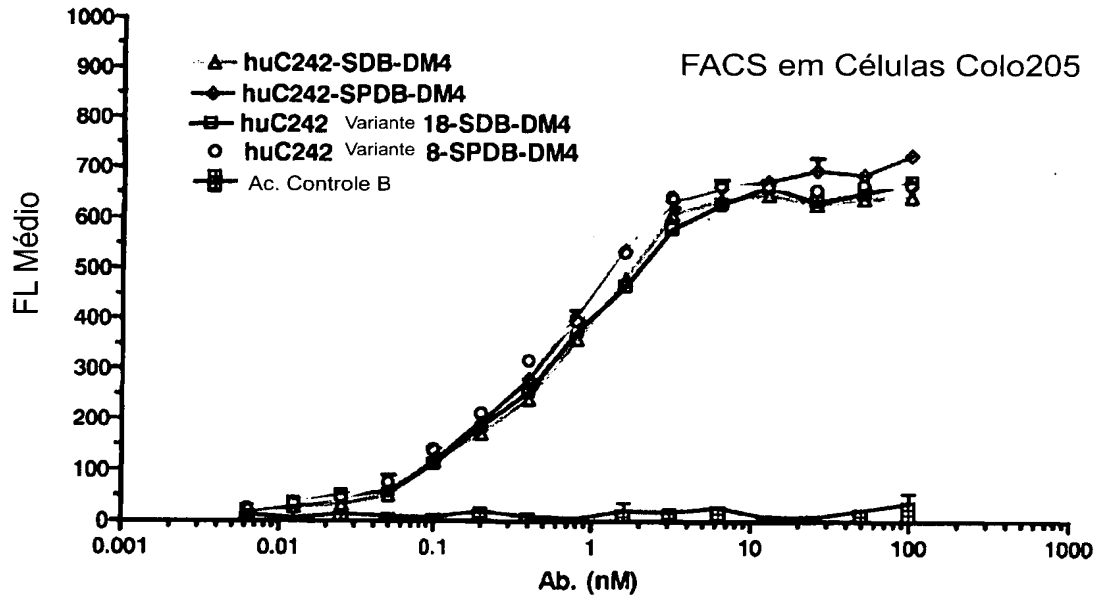
FIG. 10b

FIG. 11a



	huC242	huC242 biotina	huC242 variante 14	huC242 variante 18
Kd (nM)	0.53	0.56	0.50	0.66

FIG. 11b



Conjugado huC242	huC242-SDB-DM4	huC242-SPDB-DM4	Variante 18-SDB-DM4	Variante 8-SPDB-DM4
Kd (nM)	0.594	0.592	0.453	0.453

FIG. 11c

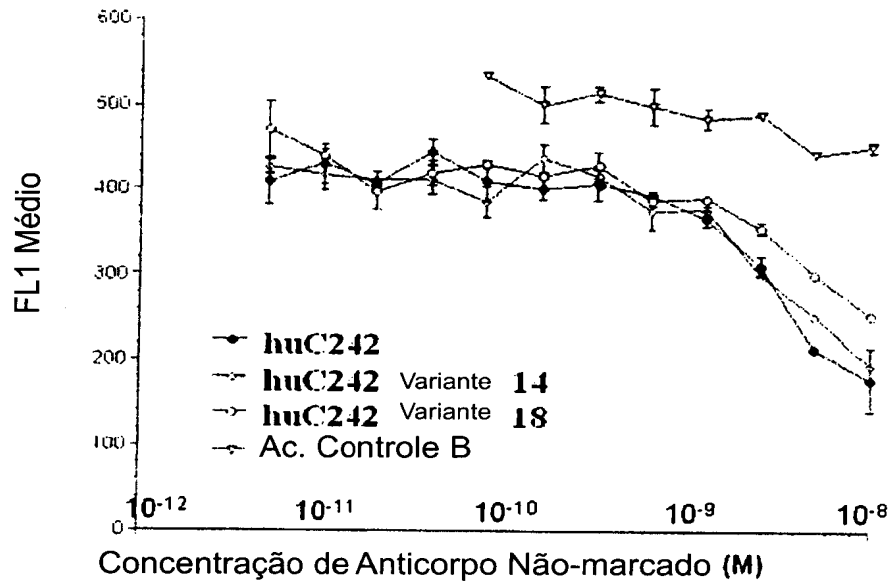


FIG. 12
Sequências inteiras do HuC242

Painel A

Sequência proteica de HC

1	MGWSCIIIFL	VATATGVHSQ	VQLVQSGAEV	KKPGETVKIS	CKASDYTFY
51	YGMNWKQAP	GQGLKWMGI	DTTGEPTYA	QKFQGRIAFS	LETSASTAYL
101	QIKSLKSED	ATYFCARRGP	YNWYFDVWGQ	GTTVTVSSAS	TKGPSVFPLA
151	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL
201	YSLSSVTVF	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPPC
251	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
301	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP
351	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV
401	EWESNGQPEN	NYKTPPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSQSVMH
451	EALHNHYTQK	SLSLSPGK			

Sequência de DNA da HC

1	ATGGGATGG	AGCTGTATC	ATCCTCTTC	TTGGTAGCA	ACAGCTACA	GGTGTCCAC
55	TCCCAGGTC	CAGTTGGTG	CAGTCTGGA	GCCGAGGTG	AAGAAGCCT	GGAGAGACA
109	GTCAAGATC	TCCTGCAAG	GCTTCTGAT	TATACCTTC	ACATACTAT	GGAAATGAAC
163	TGGGTGAAG	CAGGCTCCG	GGACAGGGT	CTGAAGTGG	ATGGGCTGG	ATCGACACC
217	ACCACTGGA	GAGCCAACA	TATGCTCAG	AAGTTTCAG	GGACGGATT	GCCTTCTCT
271	TTGGAGACC	TCTGCCAGC	ACTGCCTAT	CTGCAGATC	AAAAGCCTG	AAATCTGAG
325	GACACCGCT	ACATATTTT	TGTGCCAGA	CGGGGGCCT	TACAACCTG	TACTTTGAT
379	GTCTGGGGC	CAGGGGACC	ACGGTCACC	GTCTCCTCA	GCCTCCACC	AAGGGCCCA
433	TCGGTCTTC	CCCCTGGCA	CCCTCCTCC	AAGAGCACC	TCTGGGGGC	ACAGCGGCC
487	CTGGGCTGC	CTGGTCAAG	GACTACTTC	CCCGAACCG	GTGACGGTG	TCGTGGAAC
541	TCAGGCGCC	CTGACCAGC	GGCGTGAC	ACCTTCCCG	GCTGTCTTA	CAGTCCTCA
595	GGACTCTAC	TCCCTCAGC	AGCGTGGTG	ACCGTGCCC	TCCAGCAGC	TTGGGCACC
649	CAGACCTAC	ATCTGCAAC	GTGAATCAC	AAGCCCAGC	AACACCAAG	GTGGACAAG
703	AAAGTTGAG	CCCAAATCT	TGTGACAAA	ACTCACACA	TGCCACCG	TGCCCAGCA
757	CCTGAACTC	CTGGGGGGA	CCGTCAGTC	TTCTCTTTC	CCCCCAAAA	CCCAAGGAC
811	ACCCTCATG	ATCTCCCGG	ACCCCTGAG	GTCACATGC	GTGGTGGTG	GACGTGAGC
865	CACGAAGAC	CCTGAGGTC	AAGTTCAAC	TGGTACGTG	GACGGCGTG	GAGGTGCAT
919	AATGCCAAG	ACAAAGCCG	CGGGAGGAG	CAGTACAAC	AGCACGTAC	CGTGTGGTC
973	AGCGTCCTC	ACCGTCCTG	CACCAGGAC	TGGCTGAAT	GGCAAGGAG	TACAAGTGC
1027	AAGGTCTCC	AACAAAGCC	CTCCAGGCC	CCCATCGAG	AAAACCATC	TCCAAAGCC
1081	AAAGGGCAG	CCCCGAGAA	CCACAGGTG	TACACCCTG	CCCCCATCC	CGGGATGAG
1135	CTGACCAAG	AACCAGGTC	AGCCTGACC	TGCCTGGTC	AAAGGCTTC	TATCCCAGC
1189	GACATCGCC	GTGGAGTGG	GAGAGCAAT	GGCAGCCG	GAGAACAAC	TACAAGACC
1243	ACGCCTCCC	GTGCTGGAC	TCCGACGGC	TCCTCTTTC	CTCTACAGC	AAGCTCACC
1297	GTGGACAAG	AGCAGGTGG	CAGCAGGGG	AACGTCTTC	TCATGCTCC	GTGATGCAT
1351	GAGGCTCTG	CACAACCAC	TACACGCAG	AAGAGCCTC	TCCCTGTCT	CCGGGTAAA

Painel B

Sequência proteica da LC

1MGWSCIIILFL VATATGVHSD IVMTQSPLSV PVTPGEPVSI SCRSSKSLH
 51SNGNTYLYWF LQRPGQSPQL LIYRMSNLVS GVPDRFSGSG SGTAFTLRIS
 101RVEAEDVGVI YCLOHLEYPPF TFGPGTKLEL KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
 151SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 201STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

Sequência de DNA da LC

1 ATGGGATGG AGCTGTATC ATCCTCTTC TTGGTAGCA ACAGCTACA GGTGTCCAC
 55TCCGATATT GTGATGACT CAGTCTCCA CTGTCTGTA CCTGTCACT CCTGGAGAG
 109CCTGTATCC ATCTCCTGC AGGTCTAGT AAGAGTCTC CTGCATAGT AATGGCAAC
 163ACTTACTTG TATTGGTTC CTGCAGAGG CCAGGCCAG TCTCCTCAG CTCCTGATA
 217TATCGGATG TCCAACCTG GTCTCAGGA GTCCCAGAC AGGTTCAGT GGCAGTGGG
 271TCAGGAAC TCTTTCACA CTGAGAATC AGTAGAGTG GAGGCTGAG GATGTGGGT
 325GTTTATTAC TGTCTGCAA CATCTGGAG TATCCGTTT ACGTTCGGT CCTGGGACC
 379AAGCTGGAG CTGAAACGA ACTGTGGCT GCACCATCT GTCTTCATC TTCCCGCCA
 433TCTGATGAG CAGTTGAAA TCTGGAATC GCCTCTGTT GTGTGCCTG CTGAATAAC
 487TCTATCCC AGAGAGGCC AAAGTACAG TGAAGGTG GATAACGCC CTCCAATCG
 541GGTAACTCC CAGGAGAGT GTCACAGAG CAGGACAGC AAGGACAGC ACCTACAGC
 595CTCAGCAGC ACCCTGACG CTGAGCAAA GCAGACTAC GAGAAACAC AAAGTCTAC
 649GCCTGCGAA GTCACCCAT CAGGGCCTG AGCTCGCCC GTCACAAAG AGCTTCAAC
 703AGGGGAGAG TGT

Painel C

Sequência do Domínio Variável da HC de HuC242

```

      16      26      46
1     QVQLVQSGAE VKKPGETVKI SCKASDYTFT YGMNWVKQA PGQGLKWMGW
51    IDTTTGEPTY AQKFOGRIAF SLETSASTAY LQIKSLKSED TATYFCARRG
101   PYNWYFDVWG QGTTVTVSS                82A      89

```

16 E (GAG) to 16 A (GCC)

26 D (GAC) to 26 G (GGC)

46 K (AAA) to 46 E (GAA)

82A K (AAA) to 82A S (AGC)

89 T (ACC) to 89 V (GTC)

Sequência do Domínio Variável da LC de HuC242

```

                                45
1     DIVMTQSPLS VPVTPGEPVS ISCRSSKSLL HSNNGTYLYW FLQRPQSPQ
51    LLIYRMSNLV SGVPDRFSGS GSGTAFTRLI SRVEAEDVGV YYCLQHLEYP
101   FTFGPGTKLE LKR                70

```

45 Q (CAG) to 45 R (CGG)

70 A (GCT) to 70 D (GAT)

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO HUMANIZADO, MURINO HUMANIZADO OU ANTICORPO PARENTAL; OU UM FRAGMENTO, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A EPITOPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DOS MESMOS EM UMA CÉLULA HOSPEDEIRA PELA RE-ENGENHARIA DE SEQUÊNCIA, ANTICORPO E ANTICORPO VARIANTE OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A EPITOPO DO MESMO E ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO"**.

A presente invenção engloba a produção de variantes de anticorpo tais como variante de huC242, ou fragmentos do mesmo em que as variantes são produzidas pela substituição de um ou mais resíduos de aminoácido em um anticorpo parental. Tal(is) substituição(ões) é(são) preferencialmente feita(s) na sequência da estrutura da região variável compreendendo uma cadeia pesada e uma leve. Como uma consequência de tal(is) substituição(ões), anticorpos variantes ou fragmentos dos mesmos mostram síntese de anticorpos aumentada quando introduzidos em uma célula hospedeira quando comparado com um anticorpo parental.