



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

(21) PI 1013085-3 A2



(22) Data do Depósito: 13/05/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2020

(54) Título: IMUNOGLOBULINAS ANTI-CD52 HUMANA

(51) Int. Cl.: C12P 21/08; A61K 39/00; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 13/05/2009 US 61/177,837.

(71) Depositante(es): GENZYME CORPORATION.

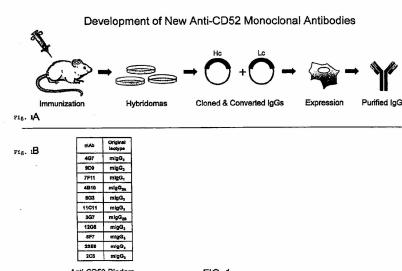
(72) Inventor(es): BRUCE L. ROBERTS; SRINIVAS SHANKARA; WILLIAM HAROLD BRONDYK; WILLIAM M. SIDERS.

(86) Pedido PCT: PCT US2010034704 de 13/05/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/132659 de 18/11/2010

(85) Data da Fase Nacional: 11/11/2011

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD52 HUMANA OU PARTE DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTE E SEU USO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO O CODIFICANDO E SEU USO, BEM COMO CADEIA LEVE OU PARTE DESTA DE ANTICORPO, CADEIA PESADA OU PARTE DESTA DE ANTICORPO E CÉLULA HOSPEDEIRA. A presente invenção refere-se a imunoglobulinas humanizadas, anticorpos monoclonais de camundongo e anticorpos quiméricos que possuem especificidade de ligação por CD52 humana. A presente invenção refere-se ainda a uma cadeia leve e humanizada de imunoglobulina e a uma cadeia pesada humanizada de imunoglobulina. A invenção refere-se também a ácidos nucleicos isolados, vetores recombinantes e células hospedeiras que compreendem uma sequência que codifica uma imunoglobulina humanizada ou cadeia leve ou cadeia pesada de imunoglobulina e a um método para preparar uma imunoglobulina humanizada. As imunoglobulinas humanizadas podem ser usadas em aplicações terapêuticas para tratar, por exemplo, doença autoimune, câncer, linfoma não Hodgkin, esclerose múltiplas e leucemia linfocítica crônica.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD52 HUMANA OU PARTE DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTE E SEU USO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO O CODIFICANDO E SEU USO, BEM COMO CADEIA LEVE OU PARTE DESTA DE ANTICORPO, CADEIA PESADA OU PARTE DESTA DE ANTICORPO E CÉLULA HOSPEDEIRA".

Este pedido de patente reivindica prioridade deste ao Pedido de Patente U.S. Provisório 61/177 837, depositado em 13 de maio de 2009, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

Antecedentes da invenção

CD52 é uma proteína glicosilada, glicosilfosfatidilinositol (GPI), ancorada na superfície celular e encontrada em abundância (500.000 moléculas/célula) em uma variedade de células linfoides normais e malignas (por exemplo, células T e B). Consultar, *por exemplo*, Hale *et al.*, *J Biol regul Homeost Agents* 15:386-391 (2001); Huh *et al.*, *Blood* 92: Abstract 4199 (1998); Elsner *et al.*, *Blood* 88:4684-4693 (1996); Gilleece *et al.*, *Blood* 82:807-812 (1993); Rodig *et al.*, *Clin Cancer Res* 12:7174-7179 (2006); Ginaldi *et al.*, *Leuk Res* 22:185-191 (1998). CD52 é expressa em níveis mais baixos em células mieloides, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, com pouca expressão encontrada em células *natural killer* (NK) maduras, neutrófilos e células-tronco hematológicas. *Id.* CD52 é produzida também por células epiteliais no epidídimos e duto deferente, e adquirida por espermatozoides durante a passagem através do trato genital (Hale *et al.*, 2001, *supra*; Domagala *et al.*, *Med Sci Monit* 7:325-331 (2001)). A função biológica exata de CD52 permanece incerta, porém algumas evidências sugerem que possa estar envolvida em migração e co-estimulação de células T (Rowan *et al.*, *Int Immunol* 7:69-77 (1995); Masuyama *et al.*, *J Exp Med* 189:979-989 (1999); Watanabe *et al.*, *Clin Immunol* 120:247-259 (2006)).

Campath-1H® (alentuzumab, Campath®, MabCampath®) é um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD52 humana que exibe potentes efeitos citotóxicos *in vitro* (citotoxicidade mediada por células dependente de

anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC)). Campath® reconhece um epítopo, constituído pelos quatro aminoácidos na carboxila terminal da proteína CD52 madura e uma parte da âncora GPI carregada negativamente. Graças aos seus efeitos citotóxicos significativos,

Campath® é capaz de depletar células CD52 positivas *in vivo*, sendo aprovado para o tratamento de primeira linha e de terceira linha de leucemia linfocítica crônica (CLL). Campath® foi avaliado quanto à sua utilidade no tratamento de várias doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide, vasculite, miosite e doença de Wegener. No entanto, os estudos mais avançados de Campath® são no tratamento de esclerose múltipla (MS) recidivante-remitente. Estes estudos mostraram melhora significativa em tempo para recidiva em relação a um comparador ativo (Rebif® (ou seja, interferon beta-1a)).

Existe necessidade de agentes terapêuticos e abordagens adicionais direcionados para CD52.

Sumário da invenção

Imunoglobulinas humanizadas

A invenção refere-se a imunoglobulinas humanizadas com especificidade de ligação por CD52 humana (huCD52). Estas podem compreender as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de anticorpos de camundongo anti-CD52 humana. As imunoglobulinas humanizadas da invenção contêm sequências de aminoácidos que são diferentes de outras imunoglobulinas humanizadas e, especificamente, de outras imunoglobulinas humanizadas que compreendem CDRs de anticorpos murinos anti-CD52 humana. As imunoglobulinas humanizadas da invenção são diferentes da imunoglobulina humanizada Campath®. Em algumas concretizações, estas oferecem vantagens sobre anticorpos humanizados que compreendem as CDRs de Campath®.

As imunoglobulinas humanizadas descritas neste relatório podem compreender uma cadeia pesada humanizada e uma cadeia leve humanizada. Em uma concretização, a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 3 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 16; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 4 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, to-

das as três CDRs) da SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 5 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 6 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs da SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 7 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 8 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 21; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 9 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 10 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 11 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 12 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 25; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 12 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 137; ou uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 13 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 26. As CDRs nas SEQ ID NOs citadas acima são indicadas pelas Figuras 2 e 3 e mencionadas nas Tabelas 1 – 6 apresentadas neste relatório descritivo.

Em outra concretização, a imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana compreende uma cadeia leve in-

cluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três), selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, 5 SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48; uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três) selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, 10 SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, 15 SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294; ou uma cadeia leve e uma cadeia pesada de tal modo que a imunoglobulina humanizada não seja Campath®.

Em outra concretização, a imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana compreende uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13; uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, 20 SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 137; ou uma cadeia leve e uma cadeia pesada de tal modo que a imunoglobulina humanizada não seja Campath®.

Em algumas concretizações, a região *framework* (arcabouço) da imunoglobulina humanizada possui pelo menos 50% de homologia à região 30 *framework* da imunoglobulina a partir da qual as CDRs da cadeia leve CDRs e as CDRs da cadeia pesada são obtidas. Por exemplo, a região *framework* da imunoglobulina humanizada pode ser pelo menos 50%, pelo menos 60%,

pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou mesmo 100% idêntica a uma sequência da linhagem germinativa de imunoglobulina humana. Em uma concretização, a região *framework* da imunoglobulina humanizada pode ser obtida ou derivada de uma região variável de um anticorpo IgG humano. Em outra concretização, a CD52 é CD52 humana do tipo selvagem. Em ainda outra concretização, a imunoglobulina humanizada pode competir com alemtuzumabe pela ligação a CD52 humana, por exemplo, pode ligar-se a um epítopo que seja idêntico ou que se sobreponha ao epítopo ao qual o alemtuzumabe se liga.

A invenção refere-se também a uma cadeia leve humanizada de uma imunoglobulina humanizada da invenção. Em uma concretização, a cadeia leve humanizada compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48 ou uma combinação destas, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outra concretização, a cadeia leve humanizada compreende uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

A invenção refere-se também a uma cadeia pesada humanizada de uma imunoglobulina humanizada da invenção. Em uma concretização, a cadeia pesada humanizada compreende uma ou mais CDRs de um domínio variável de Ig, selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID

NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294, ou uma combinação destas, em que a cadeia pesada humanizada não é a cadeia pesada
5 humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, a cadeia pesada humanizada compreende uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID
10 NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 137, em que a cadeia pesada humanizada não é a cadeia pesada humanizada de Campath®.

De preferência, as imunoglobulinas humanizadas da presente invenção compreendem tanto uma cadeia leve humanizada da invenção como uma cadeia pesada humanizada da invenção.

15 Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina humanizada que se liga ao mesmo epítopo em CD52 humana, ou com o qual compete direta ou indiretamente, que um anticorpo monoclonal de camundongo compreendendo uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 16; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 17; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 5 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 18; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 19; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID
20 NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 20; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 21; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 9 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 22; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 23; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 24; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 12 e uma região variável de
25
30

cadeia pesada da SEQ ID NO: 25; ou uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 13 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 26. Em outras concretizações, a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo em CD52 humana que se sobrepõe ao epítopo ao qual tal anticorpo monoclonal de camundongo se liga.

Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina humanizada que se liga a um epítopo em CD52 humana (por exemplo, SEQ ID NO: 104), compreendendo pelo menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura (em que o resíduo 1 é o N-terminal da sequência da CD52 madura, ou seja, o resíduo de glicina [G] em N-terminal; consultar a Figura 4). A imunoglobulina humanizada pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura (estes resíduos sendo de glicina [G], asparagina [N], aspartato [D] e treonina [T], respectivamente). A imunoglobulina humanizada pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura (estes resíduos sendo de glicina [G], glutamina [Q], asparagina [N], aspartato [D] e treonina [T], respectivamente). Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina humanizada que se liga a um epítopo, em CD52 humana, compreendendo pelo menos os resíduos 7, 8 e 9 da sequência da CD52 humana madura (estes resíduos sendo de glutamina [Q], treonina [T] e serina [S], respectivamente). Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 7 (Q), 8 (T) e 11 (P) da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 4 (D) e 11 (P) da sequência da CD52 humana madura.

Em algumas concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina humanizada que se liga a CD52 humana e que compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), ou uma cadeia pesada, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas as três das referi-

das CDRs) ou tal cadeia leve e tal cadeia pesada. Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina humanizada que se liga a CD52 humana e que compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 5 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), ou uma cadeia pesada, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), ou tal cadeia leve e tal cadeia pesada. Em ainda outras concretizações, a invenção provê uma imuno-10 globulina humanizada que se liga a CD52 humana e que compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), ou uma cadeia pesada, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ 15 ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), ou tal cadeia leve e tais cadeias pesadas.

Em certas concretizações, a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve incluindo as CDRs da SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 e uma cadeia pesada incluindo as CDRs da 20 SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130. Em outras concretizações, a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve incluindo as CDRs da SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 e uma cadeia pesada incluindo as CDRs da SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131. Em outras concretizações, a imunoglobulina humanizada 25 compreende uma cadeia leve incluindo as CDRs da SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 e uma cadeia pesada incluindo as CDRs da SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132.

As imunoglobulinas humanizadas da presente invenção são diferentes da imunoglobulina humanizada Campath®.

30 As sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 115-132 supracitadas são fornecidas abaixo e têm como base as sequências de aminoácidos relatadas nas Tabelas 1 – 6, conforme fornecidas em outro lugar nes-

te relatório descritivo. Nestas sequências de aminoácidos, "X" representa qualquer aminoácido e o símbolo "/" indica que um dos (ou qualquer um) aminoácidos tratados adjacentes àquele símbolo pode estar presente na posição indicada (por exemplo, K/R indica que um resíduo de lisina ou arginina está presente na posição indicada e F/L/V indica que um resíduo de fenilalanina, leucina ou valina está presente na posição indicada).

Sequências de CDR1 de cadeia leve:

K/RSSQSLLV/IXS/TN/DGXS/TYLX (SEQ ID NO: 115)

K/RSSQSLLV/IHS/TNGXS/TYLH (SEQ ID NO: 116)

10 RSSQSLVHTNGNS/TYLH (SEQ ID NO: 117)

Sequências de CDR2 de cadeia leve:

XVSXXXX (SEQ ID NO: 118)

XVSXRXS (SEQ ID NO: 119)

MVSXRES (SEQ ID NO: 120)

15 Sequências de CDR3 de cadeia leve:

XQXXXH/R/KF/L/V/IXX (SEQ ID NO: 121)

SQSXH/R/KF/I /V/IPX (SEQ ID NO: 122)

SOSXHVPE/P (SEQ ID NO: 123)

Sequências de CDR1 de cadeia pesada:

20 GEXEXXYW/YMX (SEQ ID NO: 124)

GETEXXYW/YMX (SEQ ID NO: 125)

GETETDYW/YMS (SEQ ID NO: 126)

Sequências de CDR2 de cadeia pesada

XIRXKXBXYYTXXXXSVKG (SEO ID NO: 127)

25 XIRXKXNXYTTEYXXSVKG (SEQ ID NO: 128)

EIRNKANGYTTEXXXXVKG (SEQ ID NO: 129)

Sequências de CDR3 de cadeia pesada:

XXXXX/EW (SEQ ID NO: 130)

TRYXY/EAWERY (SEQ ID NO: 131)

30 TRYIEFWEDY (SEQ ID NO: 132)

A invenção refere-se também a uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constitu-

ído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs).

A invenção refere-se também a uma cadeia pesada humanizada 10 compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas 15 as três das referidas CDRs); ou uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs).

As cadeias leves humanizadas e as cadeias pesadas humanizadas da presente invenção são diferentes da cadeia leve humanizada e das cadeias pesadas humanizadas da imunoglobulina humanizada Campath®.

Em algumas concretizações da presente invenção, as imunoglobulinas humanizadas da invenção (independentemente da maneira na qual possam ser de outra forma definidas, por exemplo, indiferentemente do fato 25 de poderem ser definidas também em termos da sequência de uma ou mais de suas CDRs e/ou por sua reatividade cruzada com um anticorpo monoclonal de camundongo ou outra imunoglobulina humanizada): (1) exibem ligação à CD52 glicosilada e desglicosilada sem preferência aparente; (2) exibem ligação específica por CD52 glicosilada; (3) exibem ligação específica 30 por CD52 desglicosilada; ou (4) exibem ligação preferencial por CD52 desglicosilada sobre a glicosilada. Em certas concretizações, as imunoglobulinas humanizadas da invenção possuem maior afinidade de ligação por

CD52 humana glicosilada do que por CD52 humana não glicosilada ou desglicosilada. De fato, em certas concretizações da presente invenção, as imunoglobulinas humanizadas da presente invenção exibem ligação que é específica por CD52 humana glicosilada. A afinidade de ligação por CD52 humana não glicosilada ou desglicosilada pode ser determinada com o uso de CD52 humana madura que tenha sido desglicosilada usando uma glicosidase, por exemplo, usando a endoglicosidase PNGase-F. Em certas concretizações da presente invenção, as imunoglobulinas humanizadas da invenção ligam-se a um epítopo em CD52 humana madura que compreende seu grupo carboidrato *N*-ligado. Este grupo carboidrato é uma polilactosamina sialilada contendo núcleo fucosilado de oligossacarídeo *N*-ligado com estrutura tetra-antenária (Treumann, A. et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270:6088-6099). Este epítopo pode compreender também pelo menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos o resíduo 3 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura ou pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, os anticorpos de camundongo ou químéricos da presente invenção podem possuir qualquer uma dessas características de ligação.

Moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam uma imunoglobulina humanizada, cadeia leve humanizada ou cadeia pesada humanizada da invenção, conforme definidas em outro lugar neste relatório descritivo, são também providas. Em algumas concretizações, a invenção é uma (uma ou mais) molécula isolada de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a cadeia leve humanizada compreende uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 3 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 16; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 4 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as

três CDRs) da SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 5 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 6 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 7 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 8 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 21; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 9 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 10 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 11 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 12 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 25; uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 12 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 137; ou uma cadeia leve compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 13 e uma cadeia pesada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) da SEQ ID NO: 26.

Em algumas concretizações, a invenção é uma ou mais moléculas

las isoladas de ácido nucleico codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se ao mesmo epítopo em 5 CD52 humana que um anticorpo monoclonal de camundongo, compreendendo uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 16; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 17; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 5 e uma região 10 variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 18; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 19; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 20; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 15 21; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 9 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 22; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 23; uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 24; uma região variável de cadeia 20 leve da SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 25; ou uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 13 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 26. Em outras concretizações, a invenção é uma ou mais moléculas isoladas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada 25 da que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo em CD52 humana que se sobrepõe ao epítopo ao qual tal anticorpo monoclonal de camundongo se liga.

Em outras concretizações, a invenção é uma ou mais moléculas 30 isoladas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em

que a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo, compreendendo pelo menos o resíduo 1 da CD52 humana madura; a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo, compreendendo pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da CD52 humana madura; a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo, compreendendo pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da CD52 humana madura; ou a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo, compreendendo pelo menos os resíduos 7, 8 e 9 da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 7, 8 e 11 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 4 e 11 da sequência da CD52 humana madura.

Em outras concretizações, a invenção é uma ou mais moléculas isoladas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs).

Em certas concretizações, a invenção é uma ou mais moléculas isoladas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em 5 que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130; uma cadeia leve incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de 10 SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131; ou uma cadeia leve incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132.

O único ou mais ácidos nucleicos da invenção não codificam a 15 imunoglobulina humanizada Campath®.

Em outras concretizações, a invenção é uma ou mais moléculas isoladas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em 20 que a imunoglobulina humanizada possui maior afinidade de ligação por CD52 humana glicosilada ou desglicosilada, por exemplo, exibe ligação que é específica por CD52 humana glicosilada. A imunoglobulina humanizada pode ligar-se a um epítopo em CD52 humana madura que compreende seu grupo carboidrato *N*-ligado. Este epítopo pode compreender também pelo 25 menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos o resíduo 3 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura ou pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura.

Em outras concretizações, a invenção é uma molécula isolada 30 de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada, compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, a invenção é uma molécula isolada
5 de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada, compre-
endendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID
NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,
SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID
NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 137, em que a cadeia pesada hu-
manizada não é a cadeia pesada humanizada de Campath®.
10

Em outras concretizações, a invenção é uma molécula isolada
de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada, compre-
endendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por
SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID
15 NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35,
SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID
NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44,
SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48, ou uma
combinação destas, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve
20 humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, a invenção é uma molécula isolada
de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada, compre-
endendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por
SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID
25 NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57,
SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID
NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66,
SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID
NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294,
30 ou uma combinação destas, em que a cadeia pesada humanizada não é a
cadeia pesada humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, a invenção é uma molécula isolada

de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada, compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia leve humanizada compreendendo 5 uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das 10 referidas CDRs).

Em outras concretizações, a invenção é uma molécula isolada de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada, compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas 15 as três das referidas CDRs); uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por 20 SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs).

A invenção refere-se também a vetores recombinantes (por exemplo, vetores de expressão, incluindo vetores de expressão em células de mamíferos) que compreendem um ácido nucleico codificador de uma imunoglobulina humanizada (por exemplo, uma cadeia leve humanizada e uma cadeia pesada humanizada), uma cadeia leve humanizada ou uma cadeia pesada humanizada da invenção. Em algumas concretizações, a invenção é um vetor recombinante, compreendendo um ácido nucleico codificador de uma imunoglobulina humanizada que compreende uma cadeia leve, incluindo 25 uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 16; uma cadeia leve incluindo uma ou mais C- 30

DRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 4 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 6 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 8 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 21; a cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 9 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 10 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 11 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 12 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 25; uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 12 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 137; ou uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 13 e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 26.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende um ácido nucleico codificador de uma cadeia leve humanizada, em que a

cadeia leve humanizada compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 5 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48, ou uma combinação destas, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outras concretizações o vetor recombinante compreende um ácido nucleico codificador de uma cadeia pesada humanizada, em que a cadeia pesada humanizada compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 10 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 15 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294, ou uma combinação destas, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em algumas concretizações, a invenção provê um vetor recombinante compreendendo uma molécula de ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreendendo moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se ao mesmo epítopo em CD52 humana que um anticorpo monoclonal de camundongo compreendendo uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia

pesada de SEQ ID NO: 19; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25; ou uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26. Em outras concretizações, a invenção provê um vetor recombinante compreendendo uma molécula de ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreendendo moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo em CD52 humana que se sobrepõe ao epítopo ao qual tal anticorpo monoclonal de camundongo se liga.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreende moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos o resíduo 1 de CD52 humana madura; liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 de CD52 humana madura; liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 de CD52 humana madura; ou liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 7, 8 e 9 de CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 7, 8 e 11 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo

compreende pelo menos os resíduos 4 e 11 da sequência da CD52 humana madura.

Em algumas concretizações, o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreende moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs).

Em certas concretizações, o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreende moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121, e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 124, SEQ ID

NO: 127 e SEQ ID NO: 130; uma cadeia leve, incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122, e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131; ou uma cadeia leve, incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e

5 SEQ ID NO: 123, e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132.

O único ou mais ácidos nucleicos no vetor ou nos vetores recombinantes da presente invenção não codificam a imunoglobulina humanizada Campath®.

10 Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreende moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada possui maior afinidade de ligação por CD52 humana glicosilada do que por CD52 humana não glicosilada ou desglicosilada, por exemplo, exibe ligação que é específica por CD52 humana glicosilada. A imunoglobulina humanizada pode ligar-se a um epítopo em CD52 humana madura que compreende seu grupo carboidrato

15 humana, em que a imunoglobulina humanizada possui maior afinidade de ligação por CD52 humana glicosilada do que por CD52 humana não glicosilada ou desglicosilada, por exemplo, exibe ligação que é específica por CD52 humana glicosilada. A imunoglobulina humanizada pode ligar-se a um epítopo em CD52 humana madura que compreende seu grupo carboidrato

20 N-ligado. Este epítopo pode compreender também pelo menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos o resíduo 3 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura ou pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura.

25 Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID

30 NO: 12 ou SEQ ID NO: 13, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende

uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três C-DRs) de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 137, em que a cadeia pesada humanizada não é a cadeia pesada humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outras concretizações o vetor recombinante compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); a cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), em que a cadeia pesada humanizada não é a cadeia pesada humanizada de Campath®.

In particular concretizações, o vetor recombinante da invenção é um vetor de expressão, tal como vetor de expressão em célula de mamífero.

ros. Em certas concretizações, o vetor é plasmídeo ou vetor viral (por exemplo, vetor adenoviral ou AAV).

A invenção refere-se também a uma célula hospedeira que compreende um (um ou mais) ácido nucleico (por exemplo, recombinante), 5 codificador de uma imunoglobulina humanizada (cadeia leve humanizada e cadeia pesada humanizada), uma cadeia leve humanizada ou de uma cadeia pesada humanizada da invenção. Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende um vetor recombinante (por exemplo, vetor de expressão, incluindo vetores de expressão em células de mamíferos) da inven-10 ção.

Em uma concretização específica, a célula hospedeira compreende um ácido nucleico (um ou mais ácidos nucleicos), codificador de uma cadeia leve humanizada e de uma cadeia pesada humanizada, em que a cadeia leve humanizada e a cadeia pesada humanizada se associam para 15 formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana e em que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 16; uma cadeia leve, incluindo 20 uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 4, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais C-CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 5, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de 25 SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 6, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 7, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs 30 (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 8, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo,

todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 21; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 9, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 10, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 11, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 12, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 25; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 12, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 137; ou uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 13, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 26.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se ao mesmo epítopo em CD52 humana que um anticorpo monoclonal de camundongo, compreendendo uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20; uma região variável de

cadeia leve de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25; ou uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26. Em outras concretizações, a célula hospedeira compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo em CD52 humana que se sobrepõe ao epítopo ao qual tal anticorpo monoclonal de camundongo se liga.

Em outras concretizações, a célula hospedeira compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos o resíduo 1 de CD52 humana madura; liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 de CD52 humana madura; liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 de CD52 humana madura; ou liga-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 7, 8 e 9 de CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 7, 8 e 11 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 4 e 11 da sequência da CD52 humana madura.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesa-

da humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs); ou uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs), e/ou uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132 (por exemplo, todas as três das referidas CDRs).

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 121, e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 130; uma cadeia leve, incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119 e SEQ ID NO: 122, e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128 e SEQ ID NO: 131; ou uma cadeia leve, incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 120 e SEQ ID NO: 123, e uma cadeia pesada incluindo as CDRs de SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 129 e SEQ ID NO: 132.

- Em outras concretizações, a célula hospedeira compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada e de uma cadeia leve humanizada que se associam para formar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a imunoglobulina humanizada possui maior afinidade de ligação por CD52 humana glicosilada do que por CD52 humana não glicosilada ou desglicosilada, por exemplo, exibe ligação que é específica por CD52 humana glicosilada. A imunoglobulina humanizada pode ligar-se a um epítopo em CD52 humana madura que compreende seu grupo carboidrato *N*-ligado. Este epítopo pode compreender também pelo menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos o resíduo 3 da sequência da CD52 humana madura, pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura ou pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura.
- Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13. A cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, a célula hospedeira compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 137. A cadeia pesada humanizada não é a cadeia pesada humanizada de Campath®.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve humanizada, em que a cadeia leve humanizada compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46,
5 SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48 ou uma combinação destas, em que a cadeia leve humanizada não é a cadeia leve humanizada de Campath®.

Em outras concretizações, a célula compreende uma molécula de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada humanizada, em que a cadeia pesada humanizada compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO:
10 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO:
15 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO:
15 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294, ou uma combinação destas, em que a cadeia pesada humanizada não é a cadeia pesada humanizada de Campath®.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo manter uma célula hospedeira a invenção (por exemplo, uma célula hospedeira que contenha um ou mais ácidos nucleicos recombinantes que codificam uma imunoglobulina humanizada da invenção (por exemplo, uma cadeia leve humanizada e uma cadeia pesada humanizada da invenção)) em condições apropriadas para expressão de uma imunoglobulina humanizada, pelo qual, cadeias da imunoglobulina humanizada são expressas e uma imunoglobulina humanizada é produzida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purificar ou isolar a imunoglobulina humanizada. Em algumas concretizações, o método compreende ainda combinar a imunoglobulina humanizada purificada ou isolada a um veículo ou carreador fisiologicamente aceitável para produzir uma composição farmacêutica.
20
25
30

A invenção refere-se também a um método para preparar uma

cadeia leve humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo manter uma célula hospedeira da invenção (por exemplo, uma célula hospedeira que contenha um ou mais ácidos nucleicos recombinantes que codificam uma cadeia leve humanizada da invenção) em condições apropriadas para expressão de uma cadeia leve humanizada, pelo qual, uma cadeia leve humanizada é expressa e uma cadeia leve humanizada é produzida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purificar ou isolar a cadeia leve humanizada.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma cadeia pesada humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo manter uma célula hospedeira da invenção (por exemplo, uma célula hospedeira que contenha um ou mais ácidos nucleicos recombinantes que codificam uma cadeia pesada humanizada da invenção) em condições apropriadas para expressão de cadeia pesada humanizada, pelo qual, uma cadeia pesada humanizada é expressa e uma cadeia pesada humanizada é produzida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purificar ou isolar a cadeia pesada humanizada.

A invenção refere-se ainda a uma composição farmacêutica, contendo uma imunoglobulina humanizada da invenção (por exemplo, compreendendo uma cadeia leve humanizada da invenção e/ou uma cadeia pesada humanizada da invenção) e um veículo ou um carreador fisiologicamente aceitável. Em algumas concretizações, a composição farmacêutica compreende uma composição de dose unitária.

A invenção refere-se ainda a um método para produzir um hibridoma que secreta um anticorpo monoclonal com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo administrar linfócitos a um camundongo transgênico para CD52 humana a um camundongo não transgênico da mesma linhagem, ou de semelhante (por exemplo, CD1) que o camundongo transgênico para a CD52 humana, produzindo, pelo mesmo, um camundongo não transgênico imunizado. Esplenócitos do camundongo não transgênico imunizado são fundidos com células imortalizadas, produzindo com isso um hibridoma. O hibridoma é mantido em condições nas quais secretará um

anticorpo monoclonal tendo especificidade de ligação por CD52 humana. Em algumas concretizações, a análise por FACS é utilizada para detectar um hibridoma que secrete um anticorpo monoclonal com especificidade de ligação por CD52 humana. Em outras concretizações, uma linhagem do camundongo transgênico e a linhagem do camundongo não transgênico são idênticas. Em certas concretizações, a CD52 é CD52 humana do tipo selvagem. Em algumas concretizações, o camundongo transgênico para CD52 e o camundongo não transgênico são camundongos CD1. Em algumas concretizações, os linfócitos usados para imunização são obtidos do baço do camundongo transgênico para CD52 humana. Em algumas concretizações, as células imortalizadas são selecionadas a partir do grupo constituído por células SP2/0 Ag14 e células de mieloma NS1. A invenção refere-se também a um hibridoma produzido pelos métodos da invenção. Opcionalmente, o anticorpo monoclonal secretado pelo hibridoma é coletado e pode ser ainda purificado (por exemplo, substancialmente purificado, isolado). Em outras concretizações, o método compreende ainda determinar a sequência de nucleotídeos do anticorpo monoclonal secretado pelo hibridoma.

A invenção refere-se também a um método para tratar uma doença autoimune (por exemplo, esclerose múltipla (MS), artrite reumatoide (RA) (Consultar, por exemplo, *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 75-92 (2007)), vasculite (Consultar, por exemplo, *Rheumatology* 39:229-237 (2000)), doença de Behcet (BD) (Consultar, por exemplo, *Rheumatology* 42:1539-1544 (2003)), lúpus e doença celíaca (Vivas, S., et al., *N. Engl. J. Med.*, 354(23):2514-2515 (2006)), vasculite, psoríase, miosite, esclerodermia, anemia aplásica e colite) em um paciente em necessidade deste, comprendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma imunoglobulina humanizada da invenção.

Em outro aspecto, uma quantidade eficaz de uma imunoglobulina humanizada da invenção pode ser administrada em conjunto com um ou mais agentes imunossupressores para preparar um paciente em necessidade deste para transplante de órgão sólido (Agarwal et al., *Transplant Immunol.*, 20:6-11 (2008)) ou transplante de células-tronco CD34+ (Burt et al., *The*

Lancet, publicação online de 30 de janeiro de 2009).

A invenção refere-se também a um método para tratar câncer em um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma imunoglobulina humanizada da invenção.

A invenção refere-se também a um método para tratar esclerose múltipla em um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma imunoglobulina humanizada da invenção.

10 A invenção refere-se também a um método para tratar leucemia linfocítica crônica em um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma imunoglobulina humanizada da invenção.

15 A administração de uma imunoglobulina humanizada da presente invenção pode compreender a administração da imunoglobulina humanizada *per se* (por exemplo, em uma composição farmacêutica), a administração de um ou mais vetores recombinantes codificadores da imunoglobulina humanizada ou a administração de uma célula hospedeira que compreenda um ou mais ácidos nucleicos (por exemplo, um ou mais vetores recombinantes) codificadores das imunoglobulinas humanizadas e que expresse a imunoglobulina humanizada.

20 A invenção refere-se também a um método para diagnosticar uma doença selecionada a partir do grupo constituído por doenças autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla, lúpus, vasculite), câncer (por exemplo, leucemias (por exemplo, leucemia linfocítica crônica) e linfomas (por exemplo, linfoma não Hodgkin)), transplante (por exemplo, transplante de órgão sólido (por exemplo, transplante de rim) e transplante de células-tronco), compreendendo analisar a amostra de um paciente *in vitro* com uma imunoglobulina humanizada da invenção.

30 A invenção refere-se também a uma imunoglobulina humanizada da invenção (por exemplo, compreendendo uma cadeia leve humanizada da invenção e/ou cadeia pesada humanizada da invenção), um vetor recombi-

nante da invenção ou a uma célula hospedeira da invenção para uso em medicina, tal como para uso em terapia e/ou diagnóstico de uma doença, tal como para uso em tratar uma doença ou transtorno descrito neste relatório, tal como doença autoimune (por exemplo, esclerose múltipla, artrite reumatoide e lúpus), câncer, condições hiperproliferativa de linfócitos (por exemplo, neoplasias malignas de células T ou B, incluindo leucemia, como leucemia linfocítica crônica de células B, e linfomas como linfoma não Hodgkin. Consultar, por exemplo, Lundin, J., et al., *Blood*, 101:4267-4272 (2003); Rodig, SJ., et al., *Clinical Cancer Research*, 12(23):7174-7179 (2006). A invenção refere-se também ao uso de uma imunoglobulina humanizada, cadeia leve humanizada ou cadeia pesada humanizada da invenção, vetor recombinante da invenção ou de uma célula hospedeira da invenção para a produção de um medicamento destinado ao tratamento de uma doença ou transtorno descrito neste relatório (por exemplo, doenças autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla, lúpus, vasculite), câncer (por exemplo, leucemias (por exemplo, leucemia linfocítica crônica) e linfomas (por exemplo, linfoma não Hodgkin)) e transplante (por exemplo, transplante de órgão sólido (por exemplo, transplante de rim) e transplante de células-tronco)).

A invenção provê ainda anticorpos humanizados anti-CD52 humana, compreendendo regiões *framework* da cadeia leve humana, que utilizam gene humano Vk2-A18b no qual os resíduos 36 (Y) e 46 (L) (numeração de Kabat) foram substituídos. Em algumas concretizações, o resíduo 36 é V ou L e o resíduo 46 é R. A invenção provê também anticorpos humanizados anti-CD52 humana, compreendendo regiões framework da cadeia pesada humana, que utilizam gene humano VH 3-23 no qual o resíduo 47 (W) (numeração de Kabat) foi substituído. Em algumas concretizações, os resíduos 47 (W) e 49 (S) (numeração de Kabat) foram ambos substituídos. Em algumas concretizações, o resíduo 47 é L e o resíduo 49 é S. Em outras concretizações, o resíduo 47 é L e o resíduo 49 é A.

Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção possui valor de EC₅₀, conforme determinado em ensaio de ligação celular, tal como o ensaio descrito no Exemplo 29, que é

duas vezes mais baixo do que o valor de EC₅₀ para o anticorpo Campath-1H®. Em várias concretizações, o valor de EC₅₀ do anticorpo humanizado anti-CD52 humana é de 11 nM ou menos.

Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção liga-se a CD52 em células na presença de anticorpos anti-Campath-1H® do soro de um paciente humano que foi tratado com Campath-1H®. Ou seja, a ligação de um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção a CD52 em células não é reduzida na presença de tais anticorpos anti-Campath-1H®, quando comparada à ligação de Campath-1H® a CD52, ou é menos reduzida na presença de tais anticorpos anti-Campath-1H® quando comparado à ligação de Campath-1H® a CD52.

A invenção provê ainda anticorpos humanizados anti-CD52 humana com perfil de depleção de linfócitos em sangue e/ou baço de um anticorpo humanizado anti-CD52 humana provido neste relatório descritivo.

Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção aumenta o nível circulante de um ou mais de TNF-alfa, IL-6 e MCP-1 no soro de um indivíduo.

Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção reduz níveis de linfócitos em um indivíduo por pelo menos 30 dias, pelo menos 50 dias, pelo menos 60 dias, pelo menos 70 dias, pelo menos 80 dias ou por mais de 80 dias.

Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção retarda o aparecimento de doença e/ou diminui a gravidade de doença, conforme medido por escore clínico em modelo de EAE de camundongo.

Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado anti-CD52 humana da invenção é menos imunogênico do que Campath-1H® em ensaio de imunogenicidade, tal como o ensaio descrito no Exemplo 69 ou 70.

30 Imunoglobulinas monoclonais de camundongo

A invenção refere-se também a anticorpos monoclonais de camundongo (imunoglobulinas monoclonais de camundongo) com especifici-

dade de ligação por CD52 humana. Em uma concretização, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 3, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 16; uma cadeia leve, 5 incluindo SEQ ID NO: 4, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 5, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 6, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 7, 10 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 8, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 21; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 9, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 10, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 11, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve, incluindo SEQ ID NO: 12, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 25; ou uma cadeia leve, 15 incluindo SEQ ID NO: 13, e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 26.

Em uma concretização, o anticorpo monoclonal de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana compreende uma região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13, ou uma região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26, ou tanto tal região variável de cadeia leve como tal região variável de cadeia pesada.

A invenção refere-se também a uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo, compreendendo a região variável de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, 30 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13.

A invenção refere-se também a uma cadeia pesada de imuno-

globulina de camundongo, compreendendo a região variável de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26.

5 De preferência, os anticorpos monoclonais de camundongo da presente invenção compreendem tanto uma cadeia leve de anticorpo de camundongo da invenção como uma cadeia pesada de anticorpo de camundongo da invenção. Em algumas concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina monoclonal de camundongo que se liga ao mesmo epítopo
10 em CD52 humana que um anticorpo monoclonal de camundongo compreendendo uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região
15 variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID
20 NO: 21; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24; uma região variável de cadeia
25 leve de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25; ou uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26. Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina monoclonal de camundongo que se liga a um epítopo em CD52 humana que se sobrepõe ao epítopo ao
30 qual tal anticorpo monoclonal de camundongo se liga.

Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina monoclonal de camundongo que se liga a um epítopo, em CD52 humana,

compreendendo pelo menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura. A imunoglobulina monoclonal de camundongo pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura, pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura ou pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 7, 8 e 9 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 7, 8 e 11 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 4 e 11 da sequência da CD52 humana madura.

A invenção refere-se também a moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam as imunoglobulinas monoclonais de camundongo, cadeias leves de imunoglobulina de camundongo ou cadeias pesadas de imunoglobulina de camundongo da invenção. Em algumas concretizações, a invenção é uma molécula isolada de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo e de uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo que se associam para formar uma imunoglobulina monoclonal de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13, ou a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26, ou tanto tal cadeia leve e tal cadeia pesada.

Em algumas concretizações, o ácido nucleico isolado codifica uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo que compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

Em outras concretizações, o ácido nucleico isolado codifica uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo que compreende uma 5 região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a vetores recombinantes (por exemplo, vetores de expressão, incluindo vetores de expressão em célula de mamífero) que compreendem um ácido nucleico codificador da imunoglobulina monoclonal de camundongo (por exemplo, uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo), da cadeia leve de imunoglobulina de camundongo ou da cadeia 15 pesada de imunoglobulina de camundongo da invenção. Em algumas concretizações, a invenção é um vetor recombinante compreendendo um ácido nucleico, ou um par de vetores recombinantes compreendendo ácidos nucleicos codificadores de uma imunoglobulina monoclonal de camundongo que compreende uma região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo 20 constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13, ou uma região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ 25 ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26, ou tanto tal região variável de cadeia leve como tal região variável de cadeia pesada.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende 30 um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo compreende SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11,

SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreende SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26.

Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo se associam para formar uma imunoglobulina monoclonal de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana. Em uma concretização, a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13, e a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

Em concretizações específicas, o vetor recombinante da invenção é um vetor de expressão, tal como vetor de expressão em célula de mamífero. Em certas concretizações, o vetor é plasmídeo ou vetor viral (por exemplo, vetor adenoviral ou AAV).

A invenção refere-se também a uma célula hospedeira que compreende um ou mais ácidos nucleicos codificadores da imunoglobulina monoclonal de camundongo (cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo), da cadeia leve de imunoglobulina de camundongo ou da cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo da invenção. Por exemplo, em algumas concretizações, a célu-

la hospedeira compreende um vetor recombinante (por exemplo, vetor de expressão, vetor de expressão em célula de mamífero) da invenção.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende ácido nucleico codificador de cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e de cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo se associam para formar uma imunoglobulina monoclonal de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana e em que a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável, selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13, e/ou a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26, ou ambas.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende ácido nucleico codificador de cadeia leve de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia leve de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende ácido nucleico codificador de cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, em que a cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma

imunoglobulina monoclonal de camundongo, compreendendo manter uma célula hospedeira da invenção (por exemplo, célula hospedeira que conte-
nha um ou mais ácidos nucleicos recombinantes (por exemplo, vetores re-
combinantes) que codificam uma imunoglobulina monoclonal de camundon-
5 go (por exemplo, cadeia leve de imunoglobulina de camundongo e cadeia
pesada de imunoglobulina de camundongo) da invenção) em condições a-
propriadas para expressão de uma imunoglobulina monoclonal de camun-
dongo, pelo qual, cadeias de imunoglobulina monoclonal de camundongo
são expressas e uma imunoglobulina monoclonal de camundongo é produ-
10 zida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purificar ou
isolar a imunoglobulina monoclonal de camundongo.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma
cadeia leve de imunoglobulina monoclonal de camundongo, compreendendo
manter uma célula hospedeira da invenção, contendo ácido nucleico codifi-
15 cador de uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo da invenção,
em condições apropriadas para expressão da referida cadeia leve de imuno-
globulina de camundongo, pelo qual uma cadeia leve é expressa. Em algu-
mas concretizações, o método compreende ainda purificar ou isolar a cadeia
leve.

20 The invenção refere-se também a um método para preparar uma
cadeia pesada de imunoglobulina monoclonal de camundongo, compreен-
dendo manter uma célula hospedeira da invenção, contendo ácido nucleico
codificador de uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo da
invenção, em condições apropriadas para expressão da referida cadeia pe-
25 sada de imunoglobulina de camundongo, pelo qual uma cadeia pesada de
imunoglobulina de camundongo é expressa. Em algumas concretizações, o
método compreende ainda purificar ou isolar a cadeia pesada de imunoglo-
bulina de camundongo.

A invenção refere-se também a um método para diagnosticar
30 uma doença (por exemplo, doenças autoimunes (por exemplo, esclerose
múltipla, lúpus, vasculite), câncer (por exemplo, leucemias (por exemplo,
leucemia linfocítica crônica) e linfomas (por exemplo, linfoma não Hodgkin))

e transplante (por exemplo, transplante de órgão sólido (por exemplo, transplante de rim) e transplante de células-tronco)), compreendendo analisar a amostra de um paciente *in vitro*, com a imunoglobulina monoclonal de camundongo da invenção (por exemplo, Lundin, J., et al., *Blood*, 101:4267-4272 (2003); Rodig, SJ, et al., *Clin. Cancer res.*, 12(23):7174-717179 (2006)).

Imunoglobulinas quiméricas

A invenção refere-se também a imunoglobulinas quiméricas que possuem especificidade de ligação por CD52 humana. Tais imunoglobulinas quiméricas podem incluir as regiões variáveis de qualquer uma das imunoglobulinas monoclonais de camundongo da presente invenção. Em uma concretização, a imunoglobulina químérica da invenção compreende a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25; ou a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a um anticorpo químérico que possui especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por: a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3, a região

variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13, e/ou uma sequência de região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por: a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a uma cadeia leve quimérica compreendendo uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

A invenção refere-se também a uma cadeia pesada quimérica compreendendo uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

De preferência, as imunoglobulinas quiméricas da presente invenção compreendem tanto uma cadeia leve quimérica da invenção como uma cadeia pesada quimérica da invenção.

Em algumas concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina quimérica que se liga ao mesmo epítopo em CD52 humana que um anti-

corpo monoclonal de camundongo compreendendo uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24; uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25; ou uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26. Em outras concretizações, a imunoglobulina quimérica liga-se a um epítopo em CD52 humana que se sobrepõe ao epítopo ao qual tal anticorpo monoclonal de camundongo se liga.

Em outras concretizações, a invenção provê uma imunoglobulina quimérica que se liga a um epítopo, em CD52 humana, compreendendo pelo menos o resíduo 1 da sequência da CD52 humana madura. A imunoglobulina quimérica pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura, pode ligar-se a um epítopo compreendendo pelo menos os resíduos 1, 2, 3, 4 e 5 da sequência da CD52 humana madura, ou pode ligar-se a um epítopo em CD52 humana compreendendo pelo menos os resíduos 7, 8 e 9 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 7, 8 e 11 da sequência da CD52 humana madura. Em algumas concretizações, o epítopo compreende pelo menos os resíduos 4 e 11 da sequência da CD52 humana madura.

A invenção refere-se também a moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam as imunoglobulinas quiméricas, as cadeias leves quiméricas ou as cadeias pesadas quiméricas da invenção. Em algumas concretizações, a invenção é uma molécula isolada de ácido nucleico (uma ou mais moléculas de ácido nucleico), codificador de uma cadeia pesada quimérica e de uma cadeia leve quimérica que se associam para formar uma imunoglobulina quimérica com especificidade de ligação por CD52 humana, em que a cadeia leve quimérica compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13; e/ou a cadeia pesada quimérica compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

Em algumas concretizações, a invenção é uma molécula isolada de ácido nucleico, codificador de uma cadeia leve quimérica que comprehende a região variável de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13.

Em algumas concretizações, a invenção é uma molécula isolada de ácido nucleico, codificador de uma cadeia pesada quimérica que comprehende a região variável de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a vetores recombinantes (por exemplo, vetores de expressão, vetores de expressão em célula de mamífero) que comprehendem um ácido nucleico codificador da imunoglobulina quimérica (cadeia leve quimérica e cadeia pesada quimérica), da cadeia leve química ou da cadeia pesada química da invenção. Em algumas concretizações, a invenção é um vetor recombinante comprendendo um ácido nucleico (ou par de vetores recombinantes comprendendo ácidos nucleicos), co-

- dificador de uma imunoglobulina quimérica que compreende uma região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e
- 5 SEQ ID NO: 13; ou uma região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26; ou tanto tal cadeia leve e cadeia pesada.
- 10 Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende um ácido nucleico codificador de uma cadeia leve quimérica, em que a cadeia leve quimérica compreende a região variável de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13.
- 15 Em outras concretizações, o vetor recombinante compreende um ácido nucleico codificador de uma cadeia pesada quimérica, em que a cadeia pesada quimérica compreende a região variável de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 ou
- 20 SEQ ID NO: 26.
- Em concretizações específicas, o vetor recombinante da invenção é um vetor de expressão, tal como vetor de expressão em célula de mamífero. Em certas concretizações, o vetor é plasmídeo ou vetor viral (por exemplo, vetor adenoviral ou AAV).
- 25 A invenção refere-se também a uma célula hospedeira que compreende um ou mais ácidos nucleicos (por exemplo, um ou mais vetores recombinantes), codificadores da imunoglobulina quimérica (cadeia leve quimérica e cadeia pesada quimérica), da cadeia leve quimérica ou da cadeia pesada quimérica da invenção. Por exemplo, em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende um vetor recombinante (por exemplo, vetor de expressão, vetor de expressão em célula de mamífero) da invenção.
- 30

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende um ácido nucleico recombinante (ou par de ácidos nucleicos recombinantes), codificador de uma cadeia leve quimérica e de uma cadeia pesada quimérica, em que a cadeia leve quimérica e a cadeia pesada quimérica associam-se para formar uma imunoglobulina quimérica com especificidade de ligação por CD52 humana e em que a cadeia leve quimérica compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13; e/ou a cadeia pesada quimérica compreende uma região variável selecionada a partir do grupo constituído pela região variável de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende um ácido nucleico recombinante, codificador de uma cadeia leve quimérica, em que a cadeia leve quimérica compreende uma região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

Em algumas concretizações, a célula hospedeira compreende um ácido nucleico recombinante, codificador de uma cadeia pesada quimérica, em que a cadeia pesada quimérica compreende uma região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma imunoglobulina quimérica, compreendendo manter uma célula hospedeira da invenção (por exemplo, célula hospedeira que contenha um ou mais ácidos nucleicos isolados que codificam uma imunoglobulina quimérica (por exemplo, cadeia leve quimérica e cadeia pesada quimérica) da invenção) em con-

dições apropriadas para expressão de uma imunoglobulina quimérica, pelo qual, cadeias de imunoglobulina quimérica são expressas e uma imunoglobulina quimérica é produzida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purificar ou isolar a imunoglobulina quimérica.

5 A invenção refere-se também a um método para preparar uma cadeia leve quimérica, compreendendo manter uma célula hospedeira da invenção (por exemplo, célula hospedeira que contenha um ácido nucleico codificador de uma cadeia leve quimérica da invenção) em condições apropriadas para expressão da referida cadeia leve quimérica, pelo qual uma 10 cadeia leve quimérica é expressa e uma cadeia leve quimérica é produzida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purificar ou isolar a cadeia leve quimérica.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma cadeia pesada quimérica, compreendendo manter uma célula hospedeira da 15 invenção (por exemplo, célula hospedeira que contenha um ácido nucleico codificador de uma cadeia pesada quimérica da invenção) em condições apropriadas para expressão da referida cadeia pesada quimérica, pelo qual uma cadeia pesada quimérica é expressa e uma cadeia pesada quimérica é produzida. Em algumas concretizações, o método compreende ainda purifi- 20 car ou isolar a cadeia pesada quimérica.

A invenção refere-se também a um método para diagnosticar uma doença selecionada a partir do grupo constituído por doenças autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla, lúpus, vasculite), câncer (por exemplo, leucemias (por exemplo, leucemia linfocítica crônica) e linfomas (por exemplo, linfoma não Hodgkin)) e transplante (por exemplo, transplante de órgão sólido (por exemplo, transplante de rim) e transplante de células-tronco), 25 compreendendo analisar a amostra de um paciente *in vitro*, com a imunoglobulina quimérica da invenção.

Concretizações adicionais desta invenção são descritas como 30 segue. Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia leve e a cadeia pesada do referido anticorpo compreendem as três regiões de-

terminantes de complementaridade (CDRs) encontradas em: SEQ ID NOs: 3 e 16, respectivamente; SEQ ID NOs: 4 e 17, respectivamente; SEQ ID NOs: 5 e 18, respectivamente; SEQ ID NOs: 6 e 19, respectivamente; SEQ ID NOs: 7 e 20, respectivamente; SEQ ID NOs: 8 e 21, respectivamente; SEQ 5 ID NOs: 9 e 22, respectivamente; SEQ ID NOs: 10 e 23, respectivamente; SEQ ID NOs: 11 e 24, respectivamente; SEQ ID NOs: 12 e 25, respectivamente; SEQ ID NOs: 12 e 137, respectivamente; ou SEQ ID NOs: 13 e 26, respectivamente. Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo em CD52 humana que o anticorpo 10 monoclonal ou parte de ligação a antígeno acima. Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo que compreende o anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno acima. Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo que compete de modo cruzado com o anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno acima.

15 Em algumas concretizações, qualquer um dos anticorpos ou de partes de ligação a antígeno acima se liga a uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO: 104. Em algumas concretizações correlatas, é possível reduzir a ligação do referido anticorpo, ou da parte, à SEQ ID NO: 104 por substituição de alanina em um ou mais dos resíduos 4, 7, 8 ou 11 da 20 SEQ ID NO: 104.

Em algumas concretizações, o anticorpo é anticorpo humanizado, anticorpo de camundongo ou anticorpo químico. Em certas concretizações, as regiões *framework* da cadeia pesada do referido anticorpo utilizam uma sequência de VH3-72 ou VH3-23 de linhagem germinativa humana, e 25 as regiões *framework* da cadeia leve do referido anticorpo utilizam uma sequência de VK2 A18b de linhagem germinativa humana.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que o referido anticorpo compreende (H)-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 de cadeia pesada e (L)-CDR1, L-CDR2 e L-CDR3 de cadeia leve, cujas sequências de aminoácidos são SEQ ID NOs: 51, 59, 69, 29, 36 e 43, respectivamente; SEQ ID NOs: 50, 60, 69, 29, 37 e 43, respectivamente; SEQ ID NOs:

50, 61, 68, 29, 38 e 43, respectivamente; SEQ ID NOs: 50, 61, 69, 29, 36 e
43, respectivamente; SEQ ID NOs: 50, 62, 69, 29, 39 e 43, respectivamente;
SEQ ID NOs: 52, 61, 70, 30, 40 e 43, respectivamente; SEQ ID NOs: 53, 63,
71, 31, 36 e 44, respectivamente; SEQ ID NOs: 54, 64, 71, 31, 36 e 45, res-
pectivamente; SEQ ID NOs: 55, 63, 72, 31, 36 e 46, respectivamente; SEQ
ID NOs: 56, 65, 73, 32, 41 e 47, respectivamente; SEQ ID NOs: 56, 65, 294,
32, 41 e 47, respectivamente; ou SEQ ID NOs: 56, 66, 74, 33, 41 e 48, res-
pectivamente.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticor-
10 po monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em
que a cadeia leve e a cadeia pesada do referido anticorpo compreendem as
sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3 e 16, respectivamente; SEQ
ID NOs: 4 e 17, respectivamente; SEQ ID NOs: 5 e 18, respectivamente;
SEQ ID NOs: 6 e 19, respectivamente; SEQ ID NOs: 7 e 20, respectivamen-
15 te; SEQ ID NOs: 8 e 21, respectivamente; SEQ ID NOs: 9 e 22, respectiva-
mente; SEQ ID NOs: 10 e 23, respectivamente; SEQ ID NOs: 11 e 24, res-
pectivamente; SEQ ID NOs: 12 e 25, respectivamente; ou SEQ ID NOs: 13 e
26, respectivamente.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticor-
20 po monoclonal ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesa-
da e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de
aminoácidos de SEQ ID NOs: 103 e 102, respectivamente; SEQ ID NOs:
136 e 138, respectivamente; SEQ ID NOs: 137 e 138, respectivamente; SEQ
ID NOs: 139 e 147, respectivamente; SEQ ID NOs: 149 e 155, respectiva-
25 mente; SEQ ID NOs: 149 e 156, respectivamente; SEQ ID NOs: 158 e 165,
respectivamente; SEQ ID NOs: 158 e 166, respectivamente; SEQ ID NOs:
159 e 165, respectivamente; SEQ ID NOs: 159 e 166, respectivamente; SEQ
ID NOs: 161 e 166, respectivamente; ou SEQ ID NOs: 163 e 166, respecti-
vamente. Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo
30 que se liga ao mesmo epítopo em CD52 humana que o anticorpo monoclo-
nal ou parte de ligação a antígeno acima. Em algumas concretizações, a
invenção refere-se a um anticorpo que compete com o anticorpo monoclonal

ou parte de ligação a antígeno acima. Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo que compete de modo cruzado com o anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno acima.

Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 272 e 273, respectivamente, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 274 e 275, respectivamente, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 276 e 278, respectivamente, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 277 e 278, respectivamente, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 279 e 280, respectivamente, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 281 e 282, respectivamente, sem as sequências de sinalização. A invenção provê também anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo em CD52 que um destes anticorpos humanizados e anticorpos que competem ou competem de modo cruzado com um destes anticorpos hu-

manizados. Em concretizações correlatas, a invenção provê composições contendo tal anticorpo humanizado e um carreador farmaceuticamente aceitável.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia leve do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 102, 138, 145-148, 153-157 e 164-168. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia leve do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 273, 275, 278, 280 e 282, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a uma cadeia leve de anticorpo ou parte desta, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 102, 138, 145-148, 153-157, 164-168, 273, 275, 278, 280 e 282, sem as sequências de sinalização, se presentes.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 103, 136, 137, 139-144, 149-152 e 158-163. Em certas concretizações, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, em que a cadeia pesada do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 272, 274, 276, 277, 279 e 281, sem as sequências de sinalização. Em certas concretizações, a invenção refere-se a uma cadeia pesada de anticorpo ou parte desta, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 103, 136, 137, 139-144, 149-152, 158-163, 272, 274, 276, 277, 279 e 281, sem as sequências de sinalização, se presentes.

Em algumas concretizações, qualquer um dos anticorpos acima

pode ser uma molécula de IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE. Em certas concretizações, o referido IgG is IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

- Em algumas concretizações, qualquer uma das partes de ligação a antígeno acima pode ser anticorpo de cadeia única, Fv, Fab, Fab', 5 F(ab')2, Fd, molécula Fv de cadeia única (scFv), dímero biespecífico de Fv de cadeia única, diobody, anticorpo com domínio deletado ou anticorpo de domínio único (dAb).

A invenção refere-se também a qualquer um dos anticorpos ou partes de ligação a antígeno acima, em que o referido anticorpo ou parte de 10 ligação a antígeno depleta linfócitos T ou B, ou ambos; de preferência, depleta linfócitos T, em comparação a linfócitos B; aumenta níveis séricos circulantes de TNF-alfa, IL-6 ou MCP-1 (por exemplo, em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 50%, pelo menos 100% ou pelo menos 200%); media citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC) 15 de células que expressam CD52; media citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células que expressam CD52; liga-se a CD52 humana apesar de a presença de anticorpos neutralizantes contra alemtuzumabe em paciente humano; e/ou promove a sinalização intracelular em células T e/ou 20 B humanas (consultar, por exemplo, Hederer *et al.*, *International Immunology* 12:505-616 (2000); Watanabe *et al.*, *Clinical Immunology* 120: 247-259 (2006)).

A invenção refere-se ainda a um ácido nucleico isolado, codificador da cadeia pesada ou de parte de ligação a antígeno desta, ou da cadeia leve ou de parte de ligação a antígeno desta de qualquer um dos 25 anticorpos acima. Em algumas concretizações, o referido ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de nucleotídeos de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 283, 285, 287, 288, 290 e 292, ou a referida sequência de nucleotídeos sem a sequência codificadora de um peptídeo de sinalização; uma sequência de nucleotídeos de cadeia 30 leve selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 284, 286, 289, 291 e 293, ou a referida sequência de nucleotídeos sem a sequência codificadora de um peptídeo de sinalização; ou ambas as referidas sequênc-

cias de nucleotídeos de cadeia pesada e de cadeia leve. Em certas concretizações, o referido ácido nucleico isolado compreende uma sequência de nucleotídeos de cadeia pesada e uma sequência de nucleotídeos de cadeia leve, selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 283 e SEQ 5 ID NO: 284, respectivamente, ambas sem as sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 285 e SEQ ID NO: 286, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 287 e SEQ ID NO: 289, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 288 e SEQ ID 10 NO: 289, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 290 e SEQ ID NO: 291, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; e SEQ ID NO: 292 e SEQ ID NO: 293, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização.

15 A invenção refere-se também ao uso de um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleotídeos de cadeia pesada e de um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleotídeos de cadeia leve para a produção de um medicamento para tratar um paciente em necessidade deste, em que a referida sequência de nucleotídeos de cadeia pesada e a sequência de nucleotídeos de cadeia leve são selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 283 e SEQ ID NO: 284, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 285 e SEQ ID NO: 286, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 287 e SEQ 20 ID NO: 289, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 288 e SEQ ID NO: 289, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; SEQ ID NO: 290 e SEQ ID NO: 291, ambas respectivamente, sem as sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; e SEQ ID NO: 292 e SEQ ID NO: 25 293, ambas respectivamente, sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização.

A invenção refere-se também a um vetor recombinante compre-

endendo (1) uma sequência de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou de parte de ligação a antígeno desta, (2) uma sequência de ácido nucleico codificadora da cadeia leve ou de parte de ligação a antígeno desta, ou (3) ambas, de qualquer um dos anticorpos acima. A invenção refere-se
5 ainda a uma célula hospedeira compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico, codificadora da cadeia pesada ou de parte de ligação a antígeno desta de qualquer um dos anticorpos acima, a referida primeira sequência de ácido nucleico, ligada operacionalmente a um elemento de controle de expressão, e uma segunda sequência de ácido nucleico, codificado
10 ra da cadeia leve ou de parte de ligação a antígeno desta do referido antícorpo, a referida segunda sequência de ácido nucleico, ligada operacionalmente a um elemento de controle de expressão. A invenção refere-se a um método para produzir um anticorpo anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, compreendendo manter a referida célula hospedeira em
15 condições apropriadas para expressão do anticorpo ou de parte, e refere-se também ao referido método compreendendo ainda a etapa de isolar o anticorpo ou a parte.

A invenção refere-se a uma composição compreendendo o anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno, de acordo com qualquer
20 uma das reivindicações 1 – 24, e um veículo ou carreador farmaceuticamente aceitável.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um método para tratar um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de qualquer um dos anticorpos acima, ou
25 de partes de ligação a antígeno, ou da composição acima. Em certas concretizações, o referido paciente está submetendo-se a um transplante.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um método para tratar uma doença autoimune em um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de qualquer
30 um dos anticorpos acima, ou de partes de ligação a antígeno, ou da composição acima. Em certas concretizações, a doença autoimune é, por exemplo, esclerose múltipla, artrite reumatoide ou lúpus eritematoso sistêmico.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um método para tratar câncer em um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de qualquer um dos anticorpos acima, ou de partes de ligação a antígeno, ou da composição acima. Em certas concretizações, o câncer é, por exemplo, linfoma como linfoma não Hodgkin; leucemia como leucemia linfocítica crônica de células B; neoplasia maligna de células T, em que o anticorpo ou parte depleta de preferência células B, em comparação a células B; ou tumor sólido.

Em algumas concretizações, qualquer um dos métodos de tratamento acima compreende ainda administrar ao paciente um agente estimulador de neutrófilos ou de células NK. Em certas concretizações, o referido agente é G-CSF ou GM-CSF. Em algumas concretizações, qualquer um dos métodos de tratamento acima compreende ainda administrar ao paciente um agente estimulador de células T reguladoras. Em certas concretizações, o referido agente é rapamicina.

Em algumas concretizações, a invenção refere-se a um método para inibir angiogênese em um paciente em necessidade deste, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de qualquer um dos anticorpos acima, ou partes de ligação a antígeno, ao paciente. Em certas concretizações, o paciente é portador de tumor sólido. Em certas concretizações, o paciente apresenta neovascularização. Em certas concretizações, a referida neovascularização é no olho.

A invenção refere-se também ao uso de qualquer um dos anticorpos acima, ou partes de ligação a antígeno, para a produção de um medicamento para tratar doença autoimune em um paciente em necessidade deste. Além disso, a invenção refere-se ao uso de qualquer um dos anticorpos acima, ou partes de ligação a antígeno, para a produção de um medicamento para tratar câncer em um paciente em necessidade deste. A invenção refere-se ao uso de qualquer um dos anticorpos acima, ou partes de ligação a antígeno, para a produção de um medicamento para tratar um paciente em necessidade de transplante. A invenção refere-se ao uso de qualquer um dos anticorpos acima, ou partes de ligação a antígeno, para a pro-

dução de um medicamento para tratar neovascularização em um paciente em necessidade deste.

A invenção refere-se também ao uso de qualquer um dos anticorpos acima, ou partes de ligação a antígeno, como medicamento.

5 Descrição resumida dos desenhos

A Figura 1A-1B é uma representação esquemática do desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais anti-CD52. O esquema geral está retratado na Figura 1A, e os nomes dos clones de anticorpos de camundongo anti-CD52 humana, bem como seus isotipos são mostrados na Figura 1B.

A Figura 2 é um alinhamento das sequências de aminoácidos de várias sequências de cadeia leve kappa de anti-CD52 humana de camundongo (SEQ ID NOS:1-13). Campath-1G é o anticorpo monoclonal de rato a partir do qual o anticorpo humanizado Campath-1H é derivado.

A Figura 3 é um alinhamento das sequências de aminoácidos de várias sequências de cadeia pesada de anti-CD52 humana de camundongo (SEQ ID NOS:14-26).

A Figura 4 é um alinhamento de CD52 do tipo selvagem e de 10 proteínas mutantes de CD52 (SEQ ID NOS: 104-114, de cima para baixo).

A Figura 5A ilustra o perfil de ligação em N-terminal, com base em FACS, dos anticorpos 4B10 e 7F11 em células mutantes que expressam CD52 por varredura de alanina.

A Figura 5B ilustra o perfil de ligação em região mediana, com base em FACS, dos anticorpos CF1D12, 3G7, 9D9, 5F7, 4G7 e 11C11 em células mutantes que expressam CD52 por varredura de alanina.

A Figura 5C ilustra o perfil de ligação, com base em FACS, dos anticorpos Campath-1H® ("Campath 1H"), 2C3, 12G6 e 23E6 em células mutantes que expressam CD52 por varredura de alanina.

A Figura 5D retrata *immunoblots* de glicosilação N-ligada +/- de CD52, sondada com o painel de anticorpos monoclonais quiméricos. "C1H" representa Campath-1H®.

A Figura 6 é um gráfico mostrando os resultados de um ensaio de CDC de 1,5 horas em vários anticorpos quiméricos anti-CD52, investiga-

dos em células CHO-K1 CD52 nº 67. Estes resultados demonstram que os anticorpos quiméricos 4B10 e 7F11 são comparáveis ou melhores do que Campath-1H® ("Campath 1H").

A Figura 7 é um gráfico mostrando os resultados de um ensaio de ADCC de 14 horas em vários anticorpos quiméricos IgG1 contra CD52, investigados em células CHO-K1 CD52 nº 67. Os resultados revelam que os anticorpos quiméricos 2C3 e 12G6 são comparáveis ou melhores do que Campath-1H® ("Campath 1-H").

As Figuras 8A-8C ilustram a ligação comparativa de vários anticorpos anti-CD52 e o anticorpo Campath-1H® ("C-1H") a populações definidas de linfócitos humanos. Estas figuras mostram a hierarquia da capacidade de ligação dos anticorpos quiméricos investigados por ensaio FACS. Curvas mais distantes à direita demonstram a capacidade mais alta de ligação, enquanto que curvas à esquerda a ligação é com afinidade mais baixa.

As Figuras 9A-9C são gráficos ilustrando o nível de células T CD4 (Figura 9A), células T CD8 (Figura 9B) e de células B CD19 (Figura 9C) no sangue, após 72 horas da administração dos anticorpos quiméricos 7F11, 8G3, 23E6, 12G6, 4B10 ou 5F7, ou de Campath-1H® ("Cam").

As Figuras 10A-10C são gráficos ilustrando o nível de células T CD4 (Figura 10A), células T CD8 (Figura 10B) e de células B CD19 (Figura 10C) no baço, após 72 horas da administração dos anticorpos quiméricos 7F11, 8G3, 23E6, 12G6, 4B10 ou 5F7, ou de Campath-1H® ("Cam").

As Figuras 11A-11C são gráficos mostrando o nível de células T CD4 (Figura 11A), células T CD8 (Figura 11B) e de células B CD19 (Figura 11C) no sangue, após 72 horas da administração dos anticorpos quiméricos 2C3, 9D9, 4B10, 3G7 ou 11C11, ou de Campath-1H® ("Cam").

A Figura 12 é um gráfico de Sobrevida de Kaplan Meier, ilustrando o percentual de camundongos sobreviventes após o tratamento com os anticorpos monoclonais quiméricos 7F11, 4B10 ou 12G6 ou com Campath-1H® ("Campath").

A Figura 13 é um gráfico de Sobrevida de Kaplan Meier, ilustrando o percentual de camundongos sobreviventes após o tratamento com

os anticorpos monoclonais quiméricos 2C3, 8G3 ou 23E6 ou com Campath-1H® ("Campath").

A Figura 14 é um gráfico de Sobrevida de Kaplan Meier, ilustrando o percentual de camundongos sobreviventes após o tratamento com 5 os anticorpos monoclonais quiméricos 9D9 ou 4B10 ou com Campath-1H® ("Campath").

A Figura 15 é um gráfico de Sobrevida de Kaplan Meier, ilustrando o percentual de camundongos sobreviventes após o tratamento com 10 os anticorpos monoclonais quiméricos 2C3 ou 11C11 ou com Campath-1H® ("Campath").

A Figura 16 é um alinhamento da sequência da região variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 96) do anticorpo 4B10 anti-CD52 humana de camundongo com a sequência de pareamento mais próximo de linhagem germinativa humana (SEQ ID NO: 97) e a sequência da região variável da 15 cadeia pesada humanizada (SEQ ID NO: 98). Adicionalmente, é mostrado um alinhamento da sequência da região variável de cadeia leve (SEQ ID NO: 99) do anticorpo 4B10 anti-CD52 humana de camundongo com a sequência de pareamento mais próximo de linhagem germinativa humana (SEQ ID NO: 100) e a sequência da região variável de cadeia leve humanizada (SEQ ID NO: 101).

A Figura 17 mostra as sequências da região variável da cadeia pesada (SEQ ID NO: 103) e da cadeia leve (SEQ ID NO: 102) de 4B10 humanizado.

A Figura 18 é um gráfico mostrando que o anticorpo humanizado 25 4B10-H1/K1 ("4B10-Humanizado") e o anticorpo químérico 4B10 se ligam de modo equivalente a células expressando CD52.

A Figura 19 é um gráfico mostrando que o anticorpo humanizado 4B10 -H1/K1 ("4B10 Humanizado") e o anticorpo químérico 4B10 median 30 atividade equivalente de ADCC em células expressando CD52.

A Figura 20 é um gráfico mostrando que o anticorpo humanizado 4B10 -H1/K1 ("4B10-Humanizado") e o anticorpo químérico 4B10 median atividade equivalente de CDC em células expressando CD52.

A Figura 21 é um gráfico ilustrando o perfil farmacocinético de anticorpos quiméricos anti-CD52 (12G6, 7F11 e 4B10), Campath-1H® ("Campath") e do anticorpo humanizado 4B10-H1/K1 anti-CD52 ("4B10 humanizado (H1/K1)") em camundongos transgênicos heterozigotos huCD52.

5 As Figuras 22A-22C são gráficos mostrando os níveis de células T CD4 (Figura 22A), células T CD8 (Figura 22B) e de células B CD19 (Figura 22C) no sangue, após 72 horas da administração do anticorpo químico 4B10 ou do anticorpo humanizado 4B10-H1/K1 ("4B10-Hu") ou de Campath-1H® ("Campath").

10 A Figura 23 é um gráfico mostrando o sumário das afinidades de ligação relativa dos anticorpos monoclonais anti-CD52.

15 A Figura 24 mostra as sequências da região variável da cadeia pesada e da leve (kappa) do 7F11 humanizado. Resíduos de aminoácidos com mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs são mostradas em negrito.

20 A Figura 25 é um histograma mostrando que os anticorpos 7F11 químico e humanizado se ligam de modo equivalente a células expressando CD52. O eixo X representa a fluorescência emitida pelo anticorpo anti-CD52 ligado, enquanto a área de cada pico representa a população total de células.

25 A Figura 26A mostra as sequências da região variável de cadeia pesada do 2C3 humanizado. Resíduos de aminoácidos com mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs são mostradas em negrito. A Figura 26B mostra as sequências de região variável da cadeia leve (kappa) do 2C3 humanizado. Resíduos com mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs são mostradas em negrito.

30 A Figura 27A é um histograma mostrando a ligação dos anticorpos 2C3 químico e humanizado em células expressando CD52. O eixo X representa a fluorescência emitida pelo anticorpo anti-CD52 ligado, enquanto a área de cada pico representa a população total de células. A Figura 27B é um histograma mostrando que o anticorpo químico e um subconjunto

dos anticorpos 2C3 humanizados se ligam de modo equivalente a células expressando CD52. O eixo X representa a fluorescência emitida pelo anticorpo anti-CD52 ligado, enquanto a área de cada pico representa a população total de células.

5 A Figura 28A mostra as sequências de região variável da cadeia pesada do 12G6 humanizado. Resíduos de aminoácidos com mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs são mostradas em negrito. A Figura 28B mostra as sequências de região variável da cadeia leve (kappa) do 12G6 humanizado. Resíduos de aminoácidos com 10 mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs são mostradas em negrito.

15 A Figura 29 é um histograma mostrando que o anticorpo quimérico e um subconjunto de anticorpos humanizados 12G6 se ligam de modo equivalente a células expressando CD52. O eixo X representa a fluorescência emitida pelo anticorpo anti-CD52 ligado, enquanto a área de cada pico representa a população total de células.

20 A Figura 30A mostra as sequências de região variável da cadeia pesada do 9D9 humanizado. Resíduos de aminoácidos com mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs são mostradas em negrito. A Figura 30B mostra as sequências de região variável da cadeia leve (kappa) do 9D9 humanizado. Resíduos de aminoácidos com mutação reversa para resíduos de camundongo estão sublinhados, e as CDRs 25 são mostradas em negrito.

25 A Figura 31 é um histograma mostrando que o anticorpo quimérico e um subconjunto dos anticorpos 9D9 humanizados se ligam de modo equivalente a células expressando CD52. O eixo X representa a fluorescência emitida pelo anticorpo anti-CD52 ligado, enquanto a área de cada pico representa a população total de células.

30 A Figura 32A mostra as curvas de ligação de Campath-1H® ("C1H"), de um anticorpo quimérico 2C3 e de um anticorpo humanizado 2C3-SFD1/K12 a células T humanas primárias e células T de camundongo transgênico huCD52. A Figura 32B mostra as curvas de ligação de Camp-

th-1H® ("C1H"), de um anticorpo quimérico 9D9 e de 9D9 humanizado a células T humanas primárias e células T de camundongo transgênico huCD52. A Figura 32C mostra as curvas de ligação de Campath-1H® ("C1H"), de um anticorpo quimérico 12G6 e de anticorpos humanizados 12G6 a células T humanas primárias e células T de camundongo transgênico huCD52.

A Figura 33 é uma tabela mostrando a eficiência relativa de ligação de Campath-1H®, de anticorpos quiméricos 2C3 e 12G6 e de anticorpos humanizados 2C3 e 12G6 a huCD52 expressando células T humanas e de camundongo transgênico.

A Figura 34 ilustra os padrões comparativos de ligação de anticorpos humanizados anti-CD52 Campath-1H®, 2C3, 12G6 e 9D9 a subconjuntos definidos de populações de células mononucleares de sangue periférico humano por citometria de fluxo. Esses histogramas mostram que a ligação do anticorpo humanizado anti-CD52 é equivalente àquela de Campath-1H® para vários subconjuntos de PBMC humano que expressam CD52. O eixo X representa a fluorescência emitida pelo anticorpo anti-CD52 ligado, enquanto a área de cada pico representa a população total de células.

A Figura 35 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 7F11 mediam atividade equivalente de ADCC em células expressando CD52.

A Figura 36 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 7F11 mediam atividade de CDC em células expressando CD52.

A Figura 37 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 2C3 mediam atividade de ADCC em células expressando CD52.

A Figura 38 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 2C3 mediam atividade de CDC em células expressando CD52.

A Figura 39 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 12G6 mediam atividade de ADCC em células expressando CD52.

A Figura 40 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e

humanizados 12G6 mediam atividade de CDC em células expressando CD52.

A Figura é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 9D9 mediam atividade de ADCC em células expressando CD52.

A Figura 42 é um gráfico mostrando que anticorpos quiméricos e humanizados 9D9 mediam atividade de CDC em células expressando CD52.

A Figura 43 é um gráfico mostrando a atividade de ADCC de anticorpos humanizados anti-CD52 em células T primárias.

A Figura 44 é um gráfico mostrando a atividade de CDC de anticorpos humanizados anti-CD52 em células T primárias.

A Figura 45 é um gráfico mostrando a neutralização de Campath-1H, mas não de outros anticorpos anti-CD52 com amostras de soro humano do estudo CAMMS223 que contêm anticorpos neutralizantes anti-Campath-1H®. As amostras de soro foram coletadas de um paciente representativo (MS-1) no Mês 12 (M12) e no Mês 13 (M13).

As Figuras 46A-46E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloídes e de neutrófilos no sangue, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10").

As Figuras 47A-47E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloídes neutrófilos e de macrófagos no baço, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10").

As Figuras 48A-48E mostram os níveis de citocinas circulantes, após 2 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10").

As Figuras 49A e 49B mostram o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após a administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10"), (mg/kg).

As Figuras 50A-50E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloídes e de neutrófilos no

sangue, após 72 horas da administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2").

As Figuras 51A-51E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloïdes e de neutrófilos no baço, após 72 horas da administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2").

As Figuras 52A-52F mostram os níveis de citocinas circulantes, após 2 horas da administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2").

As Figuras 53A e 53B mostram o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após a administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2"), (mg/kg).

As Figuras 54A e 54B mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no sangue, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath"), anticorpos quiméricos 7F11 e de anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2.

A Figura 55 mostra o nível de Campath-1H® ("Campath"), de anticorpos quiméricos 7F11 e humanizados 7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

As Figuras 56A-56E mostram os níveis de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e de neutrófilos no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12.

As Figuras 57A-57E mostram os níveis de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e de neutrófilos no baço, após 72 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12.

As Figuras 58A-58F mostram os níveis de citocinas circulantes, após 2 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3").

A Figura 59 mostra o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após a administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12, (mg/kg).

As Figuras 60A-60E mostram o nível de células T CD4+, células

T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloides, macrófagos e de neutrófilos no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11.

As Figuras 61A-61E mostram o nível de células T CD4+, células 5 T CD8+, células B B220+, células NK, macrófagos, neutrófilos e de células mieloides no baço, após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11.

As Figuras 62A-62F mostram os níveis de citocinas circulantes, após 2 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11 ("12G6 hu").

10 A Figura 63 mostra o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11, (mg/kg).

As Figuras 64A-64C mostram o nível de anticorpos quiméricos 15 2C3, 2C3-SFD1/K12, quiméricos 12G6, 12G6-SFD1/K11, quiméricos 9D9 e 9D9-H10/K12 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

As Figuras 65A-65E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloides, macrófagos e de neutrófilos no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9").

20 As Figuras 66A-66E mostram o nível de T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK, células mieloides, neutrófilos e de macrófagos no baço, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9").

25 As Figuras 67A-67F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9").

A Figura 68 mostra o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9"), (mg/kg).

30 As Figuras 69A-69D mostram o nível de populações de linfócitos em massa (células T CD4+, células T CD8+ e células B) e de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e de células NK no sangue, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de

anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 12G6-SFD1/K11 ("12G6") e 9D9-H10/K12 ("9D9").

As Figuras 70A-70D mostram o nível de populações de linfócitos em massa (células T CD4+, células T CD8+ e células B) e de subtipos de 5 células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e de células NK no baço, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 12G6-SFD1/K11 ("12G6") e 9D9-H10/K12 ("9D9").

As Figuras 71A-71F mostram os níveis de citocinas circulantes 10 após 2 horas da administração de Campath-1H® e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11 e 9D9-H10/K12.

A Figura 72 mostra o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e de células NK no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 e 9D9-H11/K12.

15 A Figura 73 mostra o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e de células NK no baço após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 e 9D9-H11/K12.

As Figuras 74A-74D mostram o nível de células T CD4+, células 20 T CD8+, células B B220+, células NK e de células mieloides no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11 ("12G6 K11") e 12G6-SFD1/K12 ("12G6 K12").

As Figuras 75A-75D mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e de células mieloides no baço, após 25 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11 ("12G6 K11") e 12G6-SFD1/K12 ("12G6 K12").

A Figura 76 mostra o nível de populações de linfócitos em massa (células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

30 As Figuras 77A-77D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e células mieloides no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-

H16/K13 e 9D9-H18/K13.

A Figura 78 mostra o nível de populações de linfócitos em massa (células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) no baço, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-
5 H18/K13.

As Figuras 79A-79D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e células mieloides no baço, após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

10 As Figuras 80A-80F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

15 As Figuras 81A e 81B mostram o nível de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

As Figuras 82A-82F mostram o nível de citocinas no sangue sobre um período de tempo de 48 horas após a administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 ou 9D9-H18/K13.

20 As Figuras 83A-83E mostram o nível de linfócitos em massa, células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e de células mieloides no baço, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 ou 9D9-H18/K13.

25 As Figuras 84A-84G mostram o repovoamento de células T CD4+ e CD8+, células T reguladoras, células B, células NK, neutrófilos e de macrófagos circulantes sobre um período de tempo após a administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12.

30 A Figura 85 mostra a capacidade de Campath-1H® FITC-marcado ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3 K12"), 12G6-SFD1/K11 ("12G6 K11"), 12G6-SFD1/K12 ("12G6 K12"), 9D9-H16/K13

("9D9 H16") e 9D9-H18/K13 ("9D9 H18") se ligarem especificamente a populações celulares de linfócitos huCD52 no baço.

As Figuras 86A-86E mostram o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) e de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e células mieloides no sangue, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

As Figuras 87A-87E mostram o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) e de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, células NK e células mieloides no baço, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

As Figuras 88A-88F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

As Figuras 89A-89D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK/mieloides no sangue, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12.

As Figuras 90A-90D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK/mieloides no baço, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12.

As Figuras 91A-91D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK/mieloides no linfonodo, após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12.

A Figura 92A mostra o nível de expressão de huCD52 em subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células

NK/mieloides em camundongos huCD52-KI/KO e em não transgênicos de controle. A Figura 92B mostra o nível de expressão de huCD52 em células T CD4+, células T CD8+ e células B em camundongos transgênicos CD1 huCD52-KI/KO e huCD52.

5 A Figura 93 mostra a ligação a huCD52 de anticorpos 12G6-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12 de várias fontes de produção ("pequena escala" e "grande escala"), em comparação a Campath-1H® de controle.

10 A Figura 94 mostra o nível de populações de linfócitos em massa (células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK) no sangue, após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12 de várias fontes de produção ("pequena escala" e "grande escala").

15 A Figura 95 mostra os níveis de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

A Figura 96 demonstra o escore clínico de EAE de 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K12 sobre um período de tempo de progressão de doença.

20 As Figuras 97A e 97B demonstram a capacidade de Campath1H® ("Campath"), 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), His435Ala 2C3-SFD1/K12 ("H435A 2C3") e His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 ("H310A/H435Q 2C3") de ligarem-se a moléculas de FcRn de camundongo e humana.

25 A Figura 98 mostra a depuração *in vivo* de 2C3-SFD1/K12 ("2C3 não modificado"), 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ("2C3-Fc mutante 1") e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 ("2C3-Fc mutante 2") em camundongos não transgênicos.

30 A Figura 99 mostra a depuração *in vivo* de 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ("2C3-Fc mutante 1") e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 ("2C3-Fc mutante 2") em camundongos transgênicos huCD52.

As Figuras 100A e 100B mostram o nível de populações de linfócito em massa (células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células

NK) no sangue e no baço, após 72 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ("2C3 Fc mutante-1") e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 ("2C3 Fc mutante-2").

As Figuras 101A e 101B são sensorgramas representativos de
5 ensaios Biacore T100 para determinar a especificidade por epítopo do anti-
corpo humanizado 12G6-SFD1/K12 e peptídeos mutantes gerados por var-
redura de alanina. A Figura 101A mostra a ausência de ligação entre 12G6-
SFD1/K12 e o peptídeo MUT 8, enquanto a Figura 101B mostra a ligação
entre 12G6-SFD1/K12 e o peptídeo MUT 9.

10 A Figura 102 mostra a análise de TCR V beta para o doador
BMS486. Células T CD4+ educadas com o grupo peptídico 986-989 de
Campath-1H® exibiram expansão preferencial de um único V beta (Vβ3).

A Figura 103 mostra a análise de TCR V para o doador BMS928.
Células T CD4+ educadas com grupos peptídicos 1066-67-68 e 1083-84-85
15 de 12G6-SFD1/K12 exibiram expansão preferencial de um único V beta
(Vβ20).

As Figuras 104A-104J mostram a avaliação de imunogenicidade
de Campath-1H®. Respostas proliferativas são mostradas individualmente
em CPM para os doadores A-J. O eixo X retrata os grupos de peptídeos u-
20 sados para estimular três vezes células T CD4+ autólogas. Cada grupo de
células T foi avaliado em triplicata com DCs autólogas pulsadas com o grupo
educador de antígeno/peptídeo (resposta específica, barra à esquerda,
branca), peptídeo irrelevante de ligação a DR (barra do meio, listrada) ou
meio (barra à direita, preta).

25 As Figuras 105A-105J mostram a avaliação de imunogenicidade
de 12G6-SFD1/K12. Respostas proliferativas são mostradas individualmente
em CPM para os doadores A-J. O eixo X retrata os grupos de peptídeos u-
sados para estimular três vezes células T CD4+ autólogas. Cada grupo de
células T foi analisado em triplicata com DCs autólogas pulsadas com o gru-
30 po peptídico educador (resposta específica, barra à esquerda, branca), pep-
tídeo irrelevante de ligação a DR (barra do meio, listrada) ou meio (barra à
direita, preta). Em grupos analisados sem o controle pelo meio, a barra à

esquerda (branca) representa DCs pulsadas com o peptídeo educador e a barra à direita (listrada) representa DCs pulsadas com o peptídeo irrelevante.

A Figura 106 mostra a sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada humanizada de 2C3-SFD1 (SEQ ID NO: 272) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve humanizada de 2C3-K12 (SEQ ID NO: 273). As sequências de sinalização estão em negrito e itálico e as CDRs estão sublinhadas.

A Figura 107 mostra a sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada humanizada de 7F11-SFD1 (SEQ ID NO: 274) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve humanizada de 7F11-K2 (SEQ ID NO: 275). As sequências de sinalização estão em negrito e itálico e as CDRs estão sublinhadas.

A Figura 108 mostra as sequências completas de aminoácidos da cadeia pesada humanizada de 9D9-H16 (SEQ ID NO: 276) e de 9D9-H18 (SEQ ID NO: 277) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve humanizada de 9D9-K13 (SEQ ID NO: 278). As sequências de sinalização estão em negrito e itálico e as CDRs estão sublinhadas.

A Figura 109 mostra a sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada humanizada de 12G6-SFD1 (SEQ ID NO: 279) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve humanizada de 12G6-K12 (SEQ ID NO: 280). As sequências de sinalização estão em negrito e itálico e as CDRs estão sublinhadas.

A Figura 110 mostra a sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada humanizada de 4B10-H1 (SEQ ID NO: 281) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve humanizada de 4B10-K1 (SEQ ID NO: 282). As sequências de sinalização estão em negrito e itálico e as CDRs estão sublinhadas.

A Figura 111 mostra a sequência completa de ácido nucleico da cadeia pesada humanizada de 2C3-SFD1 (SEQ ID NO: 283) e a sequência completa de ácido nucleico da cadeia leve humanizada de 2C3-K12 (SEQ ID NO: 284). As sequências de sinalização estão sublinhadas, os domínios va-

riáveis estão em negrito e as regiões constantes estão em itálico.

A Figura 112 mostra a sequência completa de ácido nucleico da cadeia pesada humanizada de 7F11-SFD1 (SEQ ID NO: 285) e a sequência completa de ácido nucleico da cadeia leve humanizada de 7F11-K2 (SEQ ID NO: 286). As sequências de sinalização estão sublinhadas, os domínios variáveis estão em negrito e as regiões constantes estão em itálico.

A Figura 113 mostra as sequências completas de ácido nucleico da cadeia pesada humanizada de 9D9-H16 (SEQ ID NO: 287) e de 9D9-H18 (SEQ ID NO: 288). As sequências de sinalização estão sublinhadas, os domínios variáveis estão em negrito e as regiões constantes estão em itálico.

A Figura 114 mostra a sequência completa de ácido nucleico da cadeia leve humanizada de 9D9-K13 (SEQ ID NO: 289). A sequência de sinalização está sublinhada, o domínio variável está em negrito e a região constante está em itálico.

A Figura 115 mostra a sequência completa de ácido nucleico da cadeia pesada humanizada de 12G6-SFD1 (SEQ ID NO: 290) e a sequência completa de ácido nucleico da cadeia leve humanizada de 12G6-K12 (SEQ ID NO: 291). As sequências de sinalização estão sublinhadas, os domínios variáveis estão em negrito e as regiões constantes estão em itálico.

A Figura 116 mostra a sequência completa de ácido nucleico da cadeia pesada humanizada de 4B10-H1 (SEQ ID NO: 292) e a sequência completa de ácido nucleico da cadeia leve humanizada de 4B10-K1 (SEQ ID NO: 293). As sequências de sinalização estão sublinhadas, os domínios variáveis estão em negrito e as regiões constantes estão em itálico.

25 Descrição detalhada da invenção

CD52 é uma proteína GPI glicosilada abundante, ancorada na superfície celular (aproximadamente 5×10^5 sítios de ligação a anticorpo por célula), presente em pelo menos 95% de todos os linfócitos e monócitos/macrófagos do sangue periférico humano (Hale G, et al., "The CAMPA-
30 TH-1 antigen (CD52)," *Tissue Antigens*, 35:178-327 (1990)), porém está ausente de células-tronco hematopoiéticas. Esta invenção é direcionada a imunoglobulinas (anti-CD52) que possuem especificidade de ligação (por

exemplo, especificidade epitópica) ou são seletivas para ligação à CD52 humana ou parte desta. Estas imunoglobulinas ligam-se especificamente a uma CD52 e não se ligam a moléculas que não sejam CD52. A ligação específica entre uma imunoglobulina anti-CD52 e CD52 pode ser determinada, 5 por exemplo, pelo valor de EC₅₀ da ligação da imunoglobulina a células CD52+, medido por citometria de fluxo. A ligação específica pode ser indicada por intervalo de EC₅₀ de, por exemplo, 0,5 – 10 µg/mL. As imunoglobulinas descritas neste pedido de patente podem ter especificidade de ligação por toda ou por parte de uma CD52 humana, em que a CD52 humana é 10 CD52 humana isolada e/ou recombinante, ou sobre a superfície de uma célula que expresse CD52 humana. Adicionalmente, as imunoglobulinas podem ter especificidade de ligação por uma ou mais formas de CD52 humana (por exemplo, CD52 humana glicosilada; CD52 humana desglicosilada; CD52 humana não glicosilada; e variantes alélicas). Em uma concretização, 15 as imunoglobulinas possuem especificidade de ligação por CD52 humana natural, endógena ou do tipo selvagem. A sequência de aminoácidos de CD52 humana do tipo selvagem é apresentada na Figura 4 (SEQ ID NO: 104).

As imunoglobulinas descritas neste pedido de patente podem 20 ser purificadas ou isoladas usando técnicas conhecidas. Imunoglobulinas que são "purificadas" ou "isoladas" foram separadas de moléculas (por exemplo, peptídeos) de sua fonte de origem (por exemplo, o sobrenadante de células; em uma mistura tal como em mistura de imunoglobulinas em uma biblioteca), e incluem imunoglobulinas obtidas por métodos descritos neste 25 relatório ou outros métodos adequados. Imunoglobulinas isoladas incluem imunoglobulinas substancialmente puras (essencialmente puras) e imunoglobulinas produzidas por síntese química, técnicas recombinantes e uma combinação destas.

Mais especificamente, a invenção refere-se a imunoglobulinas 30 anti-CD52 humana, fragmentos de ligação a antígeno (ou seja, partes) das imunoglobulinas, as cadeias leves das imunoglobulinas, as cadeias pesadas das imunoglobulinas e fragmentos destas cadeias leves ou cadeias pesadas.

A invenção refere-se também a imunoglobulinas maduras ou suas cadeias, tais como imunoglobulinas glicosiladas. A invenção refere-se também a imunoglobulina imatura ou precursora (proteína). A invenção refere-se também a moléculas de ácido nucleico (por exemplo, vetores) que codificam ambas 5 estas proteínas imaturas ou maduras, a vetores e células hospedeiras que compreendem tal ácido nucleico, a métodos para produzir proteínas imaturas e maduras e a métodos para usar as imunoglobulinas.

As imunoglobulinas desta invenção podem ser usadas para tratar um indivíduo em necessidade deste (por exemplo, paciente humano), 10 para depletar os linfócitos e outras células CD52+ do indivíduo (por exemplo, células cancerosas CD52+), conforme necessário. Neste relatório descritivo, "depleção de linfócitos" é um tipo de imunossupressão por redução da população de linfócitos circulantes, por exemplo, células T e/ou células B, resultando em linfopenia. As imunoglobulinas desta invenção podem ser usadas 15 também para inibir angiogênese como descrito mais detalhadamente abaixo. As imunoglobulinas desta invenção podem ser usadas também para enriquecer células-tronco Hematopoiéticas, por exemplo, em aplicações ex vivo (consultar, por exemplo, Lim *et al.*, *J. Hematology & Oncology* 1:19 (2008)).

Imunoglobulinas naturais possuem uma estrutura central comum, na qual duas cadeias leves idênticas (em torno de 24 kD) e duas cadeias pesadas idênticas (em torno de 55 ou 70 kD) formam um tetrâmero. A porção amino-terminal de cada cadeia é conhecida como a região variável (V) e pode ser distinguida das regiões constantes (C) mais conservadas do restante de cada cadeia. Dentro da região variável da cadeia leve (também 20 denominada o domínio V_L) encontra-se uma porção C-terminal, conhecida como a região J. Dentro da região variável da cadeia pesada (também denominada o domínio V_H), existe uma região D, além de a região J. A maior parte da variação de sequências de aminoácidos em imunoglobulinas está 25 confinada a três localizações separadas nas regiões V, conhecidas como regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs), as quais estão diretamente envolvidas em ligação a抗ígenos. Partindo do amino-terminal, estas regiões são designadas CDR1, CDR2 e CDR3, 30

respectivamente. As CDRs são mantidas em posição por regiões *framework* (arcabouço) (FRs) mais conservadas. Partindo do amino-terminal, estas regiões são designadas FR1, FR2, FR3 e FR4, respectivamente. As localizações de regiões CDR e FR e um sistema de numeração foram definidos por

5 Kabat *et al.* (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991), Chothia & Lesk, *Canonical Structures for the Hypervariable regions of Immunoglobulins*, *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987), e o sistema de numeração IMGT® (*The International ImMunoGene-Tics Information System*®, Lefranc, M.-P., *The Immunologist* 7, 132-136 (1999). A inspeção visual e a análise de sequências podem ser realizadas para identificar os limites de CDRs. Para esta invenção, as sequências de CDRs são definidas usando o sistema de Kabat e o sistema IMGT; ou seja, quando as CDRs definidas pelos dois sistemas não se sobrepõem inteiramente, foram incluídos todos os resíduos das sequências definidas por ambos os sistemas.

10

15

As imunoglobulinas humanas podem ser divididas em classes e subclasses, dependendo do isotipo da cadeia pesada. As classes incluem IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, nas quais as cadeias pesadas são do tipo gama (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) ou epsilon (ϵ), respectivamente. As subclasses incluem IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, nas quais as cadeias pesadas são do tipo γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 e α_2 , respectivamente. As moléculas de imunoglobulinas humanas de uma classe ou subclasse selecionada podem conter uma cadeia leve kappa (κ) ou lambda (λ). Consultar, por exemplo, *Cellular and Molecular Immunology*, Wonsiewicz, M.J., Ed., capítulo 45, pág. 41-50, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA 91991); Nisonoff, A., *Introduction to Molecular Immunology*, 2^a Ed., capítulo 4, pág. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984).

20

25

Neste relatório descritivo, os termos "imunoglobulina" e "anticorpo," os quais são usados alternadamente, referem-se a anticorpos inteiros e a fragmentos de ligação a抗ígenos (ou seja, "parte de ligação a抗ígenos" - os dois termos são usados alternadamente neste relatório descritivo, a me-

30

nos que indicado de outra forma). Fragmentos de ligação a抗ígenos de anticorpos podem estar no formato de, por exemplo, anticorpos de cadeia única, fragmentos Fv, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, moléculas Fv de cadeia única (scFv), dímeros específicos de 5 Fv de cadeia única (PCT/US92/09665), diabodies, anticorpos com domínio deletado e anticorpos de domínio único (dAbs). Consultar, por exemplo, *Nature Biotechnology* 22(9):1161-1165 (2004)). Adicionalmente, dentro da invenção, estão moléculas de ligação a抗ígeno, compreendendo VH e/ou VL. No caso de VH, a molécula pode compreender também uma ou mais 10 regiões CH1, *hinge* (articulação), CH2 e CH3. Estes anticorpos de cadeia única destinam-se também a ser abrangidos pelo termo "parte de ligação a抗ígeno" de um anticorpo.

Parte ou fragmentos de anticorpos podem ser produzidos por clivagem enzimática ou por técnicas de recombinação. Por exemplo, clivagem por papaína ou pepsina pode utilizada para gerar fragmentos Fab ou 15 F(ab')₂, respectivamente. Anticorpos podem ser produzidos também uma variedade de formas truncadas, usando genes de anticorpos nos quais um ou mais códons de parada foram introduzidos em sentido ascendente ao sítio natural de parada. Por exemplo, um construto recombinante codificador 20 da cadeia pesada de um fragmento F(ab')₂ pode ser criado de modo a incluir sequências de DNA que codificam o domínio CH₁ e região *hinge* da cadeia pesada. Fragmentos preferidos de ligação a抗ígeno possuem especificidade de ligação por CD52 humana do tipo selvagem.

Em outro aspecto, a invenção provê uma variante de anticorpo 25 ou parte deste, como descrita neste relatório, em que a referida variante liga-se especificamente à CD52 humana, porém é diferente do anticorpo de referência, ou parte deste, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácido (por exemplo, em região CDR, região FR ou domínio constante). Por exemplo, o anticorpo variante é pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo 30 menos 93%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% idêntico ao anticorpo de referência na cadeia pesada, no domínio variável da cadeia pesada, na cadeia leve ou no domínio variável da cadeia leve.

A similaridade de sequências ou identidade de polipeptídeos, a qual é referida também como identidade de sequência, é medida tipicamente usando *software* de análise de sequências. O *software* de análise de proteínas pareia sequências semelhantes, usando medidas de similaridade, atribuídas para várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições conservadoras de aminoácidos. Por exemplo, GCG contém programas como "Gap" e "Bestfit", os quais podem ser usados como parâmetros padrão para determinar a homologia de sequências ou identidade de sequências entre polipeptídeos proximamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína do tipo selvagem e uma mutéína desta. Consultar, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeos podem ser comparadas também usando FASTA, com parâmetros padrão ou recomendados, um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e percentual de identidade de sequências das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e de pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Outro algoritmo preferido ao se comparar uma sequência da invenção a um banco de dados contendo um grande número de sequências de diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente blastp ou tblastn, usando parâmetros padrão. Consultar, por exemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic acids Res.* 25:3389-402 (1997); aqui incorporados por referência neste pedido de patente.

De acordo com a invenção, um tipo de substituição de aminoácido que pode ser efetuado é trocar uma ou mais cisteínas no anticorpo, as quais podem ser quimicamente reativas, por outro resíduo, tais como, entre outros, alanina ou serina. Em uma concretização, há uma substituição de cisteína não canônica. A substituição pode ser efetuada em uma região CDR ou *framework* de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Em algumas concretizações, a cisteína é canônica. Outro tipo de substituição de aminoácido que pode ser efetuado é retirar sítios proteolíticos.

cos potenciais no anticorpo. Tais sítios podem ocorrer em uma região CDR ou *framework* de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e a retirada de sítios proteolíticos podem diminuir o risco de heterogeneidade no anticorpo produzido e,

5 dessa forma, aumentar sua homogeneidade. Outro tipo de substituição de aminoácido é eliminar pares de asparagina-glicina, que formam sítios potenciais de desamidação, alterando um ou ambos os resíduos. Em outro aspecto da invenção, o anticorpo pode ser desmunizado para reduzir sua imunogenicidade, usando as técnicas descritas em, por exemplo, a Publicação

10 PCT WO98/52976 e WO00/34317.

Outro tipo de substituição de aminoácido que pode ser efetuada em uma das variantes de acordo com a invenção é uma substituição conservadora de aminoácido. "Substituição conservadora de aminoácido" é aquela na qual um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo grupo R de cadeia lateral com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição conservadora de aminoácido não alterará substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Em casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos diferem entre si por substituições conservadoras, o percentual

15 de identidade de sequência ou grau de similaridade pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para efetuar este ajuste são bem conhecidos por aqueles versados no estado da técnica. Consultar, por exemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994).

20 Exemplos de grupos de aminoácidos tendo cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais hidroxil-alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano,

25 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: ácido aspártico e ácido glutâmico; e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Grupos preferidos para substituição conservado-

ra de aminoácidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, reposição conservadora é qualquer alteração tendo valor positivo na matriz de probabilidade em logaritmo PAM250, descrita em Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992). Reposição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração tendo valor não negativo na matriz de probabilidade em PAM250.

Em certas concretizações, substituições de aminoácidos a um anticorpo ou parte de ligação a antígeno da invenção são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação ao serem formados complexos proteicos, por exemplo, para intensificar a atividade de ADCC e CDC do anticorpo, (4) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos, mas retendo ainda a ligação específica à CD52 humana, (5) removem lisina em C-terminal e (6) adicionam ou removem sítios de glicosilação.

Em um aspecto, a invenção provê um novo e inovador polipeptídeo que seja a cadeia pesada ou a leve de um anticorpo desta invenção ou que seja uma parte contendo domínio variável da cadeia pesada ou da leve. Este polipeptídeo é útil por poder ser o parceiro de uma cadeia oposta (leve ou pesada) do anticorpo para formar uma molécula de ligação à CD52.

Imunoglobulinas humanizadas

Neste relatório, são descritas imunoglobulinas humanizadas compreendendo as CDRs de novos anticorpos de camundongo anti-CD52 humana. Em uma concretização, a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve humanizada e uma cadeia pesada humanizada cujas sequências de aminoácidos de CDRs diferem da sequência de aminoácidos de outras versões humanizadas de anticorpos anti-CD52 (por exemplo, Campath®).

O termo "imunoglobulina humanizada", neste relatório descriptivo, refere-se a uma imunoglobulina compreendendo cadeias que incluem uma ou mais CDRs (CDR1, CDR2 e CDR3) da cadeia leve e uma ou mais CDRs

(CDR1, CDR2 e CDR3) da cadeia pesada de um anticorpo anti-CD52 de origem não humana, citado também neste relatório descritivo como o anticorpo doador (por exemplo, anticorpo murino anti-CD52), e pelo menos parte de uma imunoglobulina de origem humana (por exemplo, regiões *framework* ou regiões *framework* e constante, derivadas de uma cadeia leve e/ou pesada de origem humana, tal como anticorpos com CDR enxertada com ou sem alterações na região *framework*). A imunoglobulina humanizada da invenção compreende pelo menos uma CDR que difere de pelo menos uma CDR (por exemplo, da CDR correspondente) presente em Campath®. Consultar, por exemplo, Cabilly *et al.*, Patente U.S. Nº 4 816 567; Cabilly *et al.*, Patente Europeia Nº 0 125 023 B1; Boss *et al.*, Patente U.S. Nº 4 816 397; Boss *et al.*, Patente Europeia Nº 0 120 694 B1; Neuberger, M.S. *et al.*, WO 86/01533; Neuberger, M.S. *et al.*, Patente Europeia Nº 0 194 276 B1; Winter, Patente U.S. Nº 5,225,539; Winter, Patente Europeia Nº 0 239 400 B1; Padlan, E.A. *et al.*, Pedido de Patente Europeia Nº. 0 519 596 A1. Consultar também, Ladner *et al.*, Patente U.S. Nº 4 946 778; Huston, Patente U.S. Nº 5 476 786; e Bird, R.E. *et al.*, *Science*, 242: 423-426 (1988)), referentes a anticorpos de cadeia única. Em algumas concretizações, imunoglobulinas humanizadas são anticorpos desimunizados. Consultar, por exemplo, Carr *et al.*, Patente U.S. Nº 7 264 806, referente a imunoglobulinas desimunizadas que foram modificadas para reduzir o número de epítopos potenciais em células T, reduzindo com isso a propensão para a imunoglobulina induzir uma resposta imune ao ser administrada a um humano.

Em concretizações específicas, a imunoglobulina humanizada compreende uma ou mais CDRs de cadeia leve e uma ou mais CDRs de cadeia pesada de um ou mais dos seguintes anticorpos monoclonais murinos: 8G3.25.3.5 de camundongo, 4G7.F3 de camundongo, 9D9.A2 de camundongo, 11C11.C5 de camundongo, 3G7.E9 de camundongo, 5F7.1.1.4 de camundongo, 12G6.15.1.2 de camundongo, 23E6.2.2.1 de camundongo, 2C3.3.8.1 de camundongo, 7F11.1.9.7 de camundongo e 4B10.1.2.4 de camundongo.

Em outra concretização, as imunoglobulinas humanizadas ligam-

se à CD52 humana com afinidade semelhante ou melhor do que a de Campath®. Em uma concretização específica, a imunoglobulina humanizada da presente invenção possui a especificidade de ligação de um anticorpo murino anti-CD52 humana da invenção (por exemplo, tendo especificidade para 5 CD52 humana, tendo a mesma ou semelhante especificidade epitópica) e/ou tendo a mesma função inibidora. As imunoglobulinas humanizadas podem exibir a especificidade de ligação e/ou atividade inibidora de um anticorpo murino anti-CD52 humana ou anticorpo humanizado anti-CD52 humana descrito neste relatório, e/ou a especificidade epitópica de um anticorpo murino anti-CD52 humana ou anticorpo humanizado anti-CD52 humana descrito 10 neste relatório (por exemplo, pode competir com o anticorpo murino anti-CD52 humana ou outro anticorpo humanizado anti-CD52 (por exemplo, Campath®) pela ligação à CD52, e/ou pode ter a função inibidora do anticorpo murino ou humanizado anti-CD52 humana). Em uma concretização específica, a imunoglobulina humanizada possui a especificidade de ligação, a especificidade epitópica e/ou a atividade inibidora de qualquer um dos 15 anticorpos de camundongo 8G3, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7, 5F7, 12G6, 23E6, 2C3, 7F11 e 4B10.

A parte da imunoglobulina humanizada ou da cadeia da imunoglobulina que é de origem humana (por exemplo, região *framework*; região constante) pode ser derivada de qualquer imunoglobulina ou cadeia de imunoglobulina humana adequada. Por exemplo, uma região constante humana, ou parte desta, em um anticorpo humanizado ou quimérico pode ser derivada de um gene da cadeia leve humana κ ou λ cadeia leve, e/ou de um gene 20 da cadeia pesada humana γ (por exemplo, γ1, γ2, γ3, γ4), μ, α (por exemplo, α1, α2), δ ou ε, incluindo variações alélicas. Uma região constante específica (por exemplo, IgG1), variante ou parte desta pode ser selecionada a fim de adaptar a função efetora. Por exemplo, uma região constante mutante (variante) pode ser incorporada na imunoglobulina ou cadeia da imunoglobulina 25 de modo a minimizar a ligação a receptores Fc e/ou a capacidade de fixar complemento. (Consultar, por exemplo, Winter *et al.*, GB 2 209 757 B; Morrison *et al.*, WO 89/07142; Morgan *et al.*, WO 94/29351, 22 de dezembro de 30

1994). Em uma concretização, a região *framework* humana não possui variação ou mutação em sua estrutura ou sequência. Em uma concretização específica, a região *framework* é uma sequência de região *framework* de linhagem germinativa sem mutações ou variações em sua sequência.

5 Neste relatório descritivo, o termo "linhagem germinativa" refere-se às sequências de nucleotídeos e sequências de aminoácidos dos genes de anticorpos e de segmentos de genes que são transmitidos de pais para prole via as células germinativas. Esta sequência de linhagem germinativa é distinguida das sequências de nucleotídeos codificadoras de anticorpos em
 10 células B maduras que foram alteradas por eventos de recombinação e hi-permutação durante o transcorrer da maturação das células B. Um anticorpo que "utiliza" uma determinada linhagem germinativa possui uma sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos que mais proximamente se alinha àquela sequência de nucleotídeos ou à sequência de aminoácidos que esta especi-
 15 fica. Tais anticorpos frequentemente são mutantes quando comparados à sequência da linhagem germinativa.

Em outras concretizações, o *framework* humano exibe variação ou mutação mínima da sequência de linhagem germinativa em sua estrutura ou sequência (por exemplo, menos de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos acei-
 20 tadores do *framework* foram substituídos por resíduos do *framework* doador para melhorar a afinidade de ligação, consultar Queen *et al.*, Patente U.S. Nº 5 530 101). Em uma concretização específica, um número limitado de ami-
 25 noácidos no *framework* de uma cadeia de imunoglobulina humanizada (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos) é escolhido para ser igual ao número dos aminoácidos naquelas posições na sequência doadora (ou seja, "mutação reversa"), em vez de na sequência aceitadora, para au-
 mentar a afinidade de um anticorpo compreendendo a cadeia de imunoglo-
 bulina humanizada para CD52 humana.

Regiões humanas *framework* (por exemplo, das regiões variá-
 30 veis da pesada e/ou da leve) são obtidas ou derivadas de preferência de uma região variável de anticorpo humano tendo similaridade de sequência à região análoga ou equivalente (por exemplo, regiões variáveis de cadeia pe-

sada ou leve) da região de ligação a antígeno da imunoglobulina doadora (anticorpo murino anti-CD52). Outras fontes de regiões *framework* para partes de origem humana de uma imunoglobulina humanizada incluem sequências de consenso de região variável (Consultar, por exemplo, Kettleborough, 5 C. A. et al., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Carter et al., WO 94/04679; Carter, Patente U.S. 6 407 213)). Por exemplo, a região da sequência doadora do anticorpo (por exemplo, a sequência da região variável) usada para obter a parte não humana pode ser comparada a sequências humanas como descrito em Kabat, E. A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office* (1991) para selecionar uma determinada fonte das partes humanas da imunoglobulina humanizada, por exemplo, uma fonte das regiões *framework*.

Em uma concretização, as regiões *framework* de cadeias da imunoglobulina humanizada são obtidas ou derivadas de uma região variável de Ig humana tendo pelo menos em torno de 50%, pelo menos em torno de 55%, pelo menos em torno de 60%, pelo menos em torno de 65%, pelo menos em torno de 70%, pelo menos em torno de 75%, pelo menos em torno de 80%, pelo menos em torno de 85%, pelo menos em torno de 90% ou pelo menos em torno de 95% de identidade global de sequência com a região variável da doadora não humana. Em uma concretização específica, as regiões *framework* de cadeias da imunoglobulina humanizada são obtidas ou derivadas de regiões humanas *framework* de região variável tendo pelo menos em torno de 50%, pelo menos em torno de 55%, pelo menos em torno de 60%, pelo menos em torno de 65%, pelo menos em torno de 70%, pelo menos em torno de 75%, pelo menos em torno de 80%, pelo menos em torno de 85%, pelo menos em torno de 90% ou pelo menos em torno de 95% de identidade global de sequência, com as regiões *framework* da região variável da imunoglobulina doadora não humana.

Em uma concretização, pelo menos uma das regiões *framework* (FR) da imunoglobulina humanizada é obtida ou derivada de uma ou mais cadeias de um anticorpo de origem humana. Por conseguinte, a FR pode

incluir FR1 e/ou FR2 e/ou FR3 e/ou FR4, obtidas ou derivadas de um ou mais anticorpos de origem humana (por exemplo, de uma cadeia de imunoglobulina humana, de uma sequência de consenso humana).

As partes de imunoglobulina para uso na presente invenção 5 possuem sequências idênticas ou semelhantes à de imunoglobulinas a partir das quais são derivadas ou a de variantes destas. Tais variantes incluem mutantes diferindo pela adição, deleção ou substituição (por exemplo, substituição conservadora) de um ou mais resíduos, por exemplo, diferindo em até 10 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos da sequência precursora, por uma ou mais adições, deleções ou substituições. Como indicado acima, a imunoglobulina humanizada da invenção compreende uma ou mais CDRs de um ou mais dos anticorpos murinos anti-CD52 (anticorpos doadores) descritos neste relatório. É possível efetuar alterações na região *framework*, tais como aquelas que substituem um resíduo da região *framework* de origem humana por um 15 resíduo da posição correspondente do anticorpo doador. Uma ou mais mutações, incluindo deleções, inserções e substituições de um ou mais aminoácidos na região *framework*, podem ser efetuadas. Se desejado, mutações no *framework* podem ser incluídas em um anticorpo ou cadeia humanizada, e sítios para mutação podem ser selecionados usando qualquer método a- 20 dequado, por exemplo, como descrito em WO 98/06248, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência neste pedido de patente.

Será apreciado por aquele versado no estado da técnica que, em alguns casos, resíduos flanqueando a única ou mais CDRs do(s) anti-corpo(s) murino(s) anti-CD52 podem contribuir e, às vezes, serem essenciais, direta ou indiretamente, para função (por exemplo, ligação). Por conseguinte, em algumas concretizações, um ou mais aminoácidos flanqueando uma ou mais CDRs (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos flankeadores) do *framework* murino estão incluídos também na imunoglobulina humanizada.

30 Em algumas concretizações, as regiões humanas *framework* da cadeia pesada dos anticorpos humanizados desta invenção utilizam a sequência da linhagem germinativa humana de VH3-72 ou VH3-23. Em algu-

mas concretizações, as regiões humanas *framework* da cadeia leve dos anticorpos humanizados desta invenção utilizam a sequência da linhagem germinativa humana de Vk2-A18b. Mutações reversas podem ser opcionalmente efetuadas nestas regiões FR em um ou mais dos resíduos, conforme descrito nos Exemplos de Trabalho abaixo para melhorar a afinidade de ligação à CD52 do anticorpo humanizado.

"Afinidade" é um termo do estado da técnica que descreve a força de interação de uma ligação e refere-se tipicamente à força global de ligação da imunoglobulina à CD52 humana.

Em uma concretização específica, a imunoglobulina possui atividade de ligação medida em valor de EC₅₀ de menos de 10 µg/mL (por exemplo, como determinado por citometria de fluxo). Em outra concretização, a imunoglobulina possui atividade de ligação medida em valor de EC₅₀ de menos de 5,0 µg/mL ou menos de 1,0 µg/mL (por exemplo, como determinado por citometria de fluxo).

Em algumas concretizações, a imunoglobulina liga-se à CD52 humana com afinidade (K_D ; $K_D=K_{off}$ (kd)/Kon (ka)) de 300 nM a 1 pM (ou seja, 3×10^{-7} a 1×10^{-12} M), de preferência, de 50 nM a 1 pM, mais preferivelmente de 5 nM a 1 pM e o mais preferível de 1 nM a 1 pM, por exemplo, K_D de 1×10^{-7} M ou menos, de preferência 1×10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 1×10^{-9} M ou menos, vantajosamente 1×10^{-10} M ou menos e o mais preferível 1×10^{-11} M ou 1×10^{-12} ou menos; e/ou taxa de constante K_{off} de 5×10^{-1} s⁻¹ a 1×10^{-7} s⁻¹, de preferência, de 1×10^{-2} s⁻¹ a 1×10^{-6} s⁻¹, mais preferivelmente de 5×10^{-3} s⁻¹ a 1×10^{-5} s⁻¹, por exemplo 5×10^{-1} s⁻¹ ou menos, de preferência 1×10^{-2} s⁻¹ ou menos, vantajosamente 1×10^{-3} s⁻¹ ou menos, mais preferivelmente 1×10^{-4} s⁻¹ ou menos, ainda mais preferivelmente 1×10^{-5} s⁻¹ ou menos, e o mais preferível 1×10^{-6} s⁻¹ ou menos, conforme determinado por ressonância plasmônica de superfície.

Como é evidente para aquele versado no estado da técnica, uma variedade de métodos pode ser utilizada para confirmar se imunoglobulinas produzidas de acordo com os métodos aqui providos e conhecidos no estado da técnica exibem a especificidade indispensável (por exemplo, es-

pecificidade de ligação, especificidade epitópica). Por exemplo, a função de ligação de uma imunoglobulina humanizada anti-CD52 da invenção tendo especificidade de ligação por CD52 humana pode ser detectada usando qualquer método adequando, por exemplo, ensaios que monitorem a formação de um complexo entre imunoglobulina humanizada e CD52 humana (por exemplo, fração de membrana compreendendo CD52 humana; célula portando CD52 humana, tal como célula T humana, célula B humana; célula CHO ou célula hospedeira recombinante compreendendo e expressando ácido nucleico codificador de CD52 humana; peptídeo (por exemplo, peptídeo sintético) tendo sequência de aminoácidos de CD52; suporte sólido contendo CD52 humana).

A capacidade de uma imunoglobulina da invenção (por exemplo, imunoglobulina humanizada da invenção) de ligar-se ao mesmo epítopo em CD52 humana que um determinado anticorpo monoclonal murino, quimérico ou humanizado, ou de ligar-se a um epítopo em CD52 humana que se sobreponha ao epítopo em CD52 humana ao qual um determinado anticorpo monoclonal murino, quimérico ou humanizado, pode ser rapidamente determinada usando uma variedade de técnicas conhecidas por aqueles versados no estado da técnica, incluindo, por exemplo, ensaios de ligação competitiva.

Estes podem envolver o uso de uma forma marcada do referido determinado anticorpo e medição da ligação daquele anticorpo marcado à CD52 humana na presença e na ausência de uma imunoglobulina da invenção.

"Epítopo", neste relatório descritivo, inclui qualquer determinante proteico capaz de ligar-se especificamente a uma imunoglobulina. Determinantes epitópicos consistem geralmente em agrupamentos quimicamente ativos de moléculas de superfície, tais como aminoácidos ou carboidratos ou cadeias laterais de açúcares, e em geral possuem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características específicas de carga. Um epítopo pode ser "linear" ou "conformacional". Em epítopo linear, todos os pontos de interação entre a proteína e a molécula interatuante (tal qual um anticorpo) ocorrem linearmente ao longo da sequência primária de aminoácidos da proteína. Em epítopo conformacional, os pontos de interação

ocorrem em aminoácidos na proteína que estão separados entre si. Uma vez determinado um epítopo ou antígeno desejado, é possível gerar anticorpos contra aquele epítopo, por exemplo, usando as técnicas descritas na presente invenção. Alternativamente, durante o processo de descoberta, a geração 5 e a caracterização de anticorpos podem elucidar informações sobre epítopenos desejáveis. A partir destas informações, é possível, então, rastrear competitivamente anticorpos para ligação ao mesmo epítopo. Uma abordagem para tanto é conduzir estudos de competição para descobrir anticorpos que se ligam competitivamente um com o outro, ou seja, os anticorpos competem 10 pela ligação ao antígeno.

Em uma concretização, a fim de determinar se um anticorpo em teste liga-se ao mesmo epítopo ou a sobreposto de um anticorpo humanizado desta invenção, é permitido que o anticorpo anti-CD52 da invenção ligue-se à CD52 em condições de saturação e, em seguida, é medida a capacidade do anticorpo em teste de ligar-se à CD52. Se o anticorpo em teste for capaz de ligar-se à CD52 no mesmo tempo em que o anticorpo anti-CD52 de referência, o anticorpo em teste, nesse caso, liga-se a um epítopo diferente do anticorpo anti-CD52 de referência. No entanto, se o anticorpo em teste não for capaz de ligar-se à CD52 no mesmo tempo, o anticorpo em teste, 15 nesse caso, liga-se ao mesmo epítopo, a um epítopo sobreposto ou a um epítopo em proximidade direta ao epítopo ligado pelo anticorpo anti-CD52 da invenção. Esse experimento pode ser realizado usando ELISA, RIA, BIACORETM ou citometria de fluxo. Para testar se um anticorpo anti-CD52 compete de modo cruzado com outro anticorpo anti-CD52, é possível usar o método de competição descrito acima em duas direções, ou seja, determinar se 20 o anticorpo de referência bloqueia o anticorpo em teste e vice-versa. Em algumas concretizações, o experimento é realizado usando BIACORETM.

O *binning* de epítopenos pode ser útil também para caracterizar os anticorpos desta invenção. O termo "*binning*" refere-se a um método para agrupar anticorpos com base em suas características de ligação a抗ígenos. Um processo de alto rendimento para "*binning*" anticorpos com base 30 em sua competição cruzada está descrito no Pedido de Patente Internacio-

nal Nº WO 03/48731. O "banning de epítopos" pode ser investigado permitindo que uma forma não marcada de um anticorpo anti-CD52 "A" ligue-se a um peptídeo sintético correspondente à sequência de CD52 ou a células CD52 positivas. Subsequentemente, um segundo anticorpo anti-CD52 marcado "B" é adicionado, sendo possível avaliar a quantidade de anticorpo marcado que pode ligar-se em relação a uma amostra de controle, em que as células ou o peptídeo sintético não foram expostos previamente ao anticorpo anti-CD52 "A". Alternativamente, anticorpos anti-CD52 "A" e "B" podem ser ambos marcados com diferentes fluorocromos ou substâncias químicas que possibilitam detecção, sendo possível medir as quantidades de ambos os anticorpos marcados que podem travar o peptídeo de CD52 ao mesmo tempo, usando um dispositivo capaz de detectar a marcação ou medir as quantidades de ambos os anticorpos que travam simultaneamente células CD52 positivas por citometria de fluxo. As tecnologias Biacore e Octet possibilitam investigar a ligação competitiva de formas não marcadas de anticorpos. Esse uso de formas não marcadas de anticorpos é desejado já que a modificação química de alguns anticorpos pode comprometer a atividade de ligação. Consultar também a tecnologia descrita em Jia *et al.*, *J. Immunol. Methods* 288:91-98 (2004), a qual é útil também para *bining* de epítopos.

A presente invenção provê também partes das imunoglobulinas humanizadas, tais como cadeias leves, cadeias pesadas e partes de cadeias leves e pesadas. Estas partes de imunoglobulinas podem ser obtidas ou derivadas de imunoglobulinas (por exemplo, por redução e/ou clivagem), ou produzidas ou expressas por ácidos nucleicos codificadores de parte de uma imunoglobulina ou de sua cadeia tendo a propriedade desejada (por exemplo, ligar-se à CD52 humana, similaridade de sequência). Estas partes podem ser preparadas, por exemplo, por síntese *de novo* da parte pertinente. Imunoglobulinas humanizadas compreendendo as partes desejadas (por exemplo, região de ligação a antígeno, CDR, FR, região C) de origem humana e não humana podem ser produzidas usando ácidos nucleicos sintéticos e/ou recombinantes para preparar construtos (por exemplo, cDNA) codi-

ficadores da cadeia humanizada desejada. Por exemplo, para preparar parte de uma imunoglobulina (por exemplo, parte de uma cadeia), um ou mais códons de parada podem ser introduzidos na posição desejada. Sequências de ácido nucleico (por exemplo, DNA), codificadoras de regiões variáveis humanizadas, podem ser construídas usando métodos de PCR mutagênica para alterar sequências existentes de DNA (consultar, por exemplo, Kamman, M., et al., *Nucl. Acids Res.* 17:5404 (1989)). Iniciadores de PCR que codificam as novas CDRs podem ser hibridizados com um modelo de DNA de uma região variável previamente humanizada que tem como base a mesma região variável humana, ou muito semelhante (Sato, K., et al., *Cancer Research* 53:851-856 (1993)). Se não houver disponível uma sequência semelhante de DNA para uso como modelo, um ácido nucleico, compreendendo uma sequência codificadora de uma sequência de região variável, pode ser construído a partir de oligonucleotídeos sintéticos (consultar, por exemplo, Kolbinger, F., *Protein Engineering* 8:971-980 (1993)). Uma sequência codificadora de um peptídeo de sinalização pode ser também incorporada no ácido nucleico (por exemplo, em síntese, mediante inserção em vetor). Se não houver disponível sequência de peptídeo de sinalização (por exemplo, não tipicamente presente), uma sequência de peptídeo de sinalização de outro anticorpo pode ser usada (consultar, por exemplo, Kettleborough, C.A., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991)). Com o uso destes métodos, de métodos descritos neste relatório ou de outros métodos adequados, variantes podem ser rapidamente produzidas.

A invenção refere-se a uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana e que compreende uma cadeia leve humanizada e uma cadeia pesada humanizada e/ou partes destas. Em uma concretização, a imunoglobulina humanizada compreende uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 16; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 4, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as

três CDRs) de SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais C-DRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 5, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 6, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 7, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 8, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 21; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 9, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 10, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 11, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 12, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 25; ou uma cadeia leve, incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 13, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 26.

Em uma concretização, uma imunoglobulina humanizada da invenção compreende (H)-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 de cadeia pesada, (L)-CDR1, L-CDR2 e L-CDR3 de cadeia leve, cujas sequências de aminoácidos são: a) SEQ ID NOs: 51, 59, 69, 29, 36 e 43, respectivamente; b) SEQ ID NOs: 50, 60, 69, 29, 37 e 43, respectivamente; c) SEQ ID NOs: 50, 61, 68, 29, 38 e 43, respectivamente; d) SEQ ID NOs: 50, 61, 69, 29, 36 e 43, res-

pectivamente; e) SEQ ID NOs: 50, 62, 69, 29, 39 e 43, respectivamente; f) SEQ ID NOs: 52, 61, 70, 30, 40 e 43, respectivamente; g) SEQ ID NOs: 53, 63, 71, 31, 36 e 44, respectivamente; h) SEQ ID NOs: 54, 64, 71, 31, 36 e 45, respectivamente; i) SEQ ID NOs: 55, 63, 72, 31, 36 e 46, respectivamente; j) SEQ ID NOs: 56, 65, 73, 32, 41 e 47, respectivamente; k) SEQ ID NOs: 56, 65, 294, 32, 41 e 47; ou l) SEQ ID NOs: 56, 66, 74, 33, 41 e 48, respectivamente.

Em outra concretização, uma imunoglobulina humanizada desta invenção compreende H-CDR3 e L-CDR3, cujas sequências são a) SEQ ID NOs: 69 e 43, respectivamente; b) SEQ ID NOs: 68 e 43, respectivamente; c) SEQ ID NOs: 70 e 43, respectivamente; d) SEQ ID NOs: 71 e 44, respectivamente; e) SEQ ID NOs: 71 e 45, respectivamente; f) SEQ ID NOs: 72 e 46, respectivamente; g) SEQ ID NOs: 73 e 47, respectivamente; h) SEQ ID NOs: 294 e 47, respectivamente; ou i) SEQ ID NOs: 74 e 48, respectivamente.

Em outra concretização, a imunoglobulina humanizada possui especificidade de ligação por CD52 humana e compreende uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48, ou uma combinação destas; e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294, ou uma combinação destas; em que a imunoglobulina humanizada não é Campath®.

Em outra concretização, a imunoglobulina humanizada que possui especificidade de ligação por CD52 humana compreende uma cadeia leve incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, 5 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13, e uma cadeia pesada incluindo uma ou mais CDRs (por exemplo, todas as três CDRs) de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou 10 SEQ ID NO: 137, em que a imunoglobulina humanizada não é Campath®.

A invenção refere-se também a uma cadeia leve humanizada de imunoglobulina da imunoglobulina humanizada aqui descrita. Em uma concretização, a cadeia leve imunizada de imunoglobulina compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 27, 15 SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48, e uma combinação destas, em que a cadeia leve humanizada de imunoglobulina não é a cadeia leve de Campath®. Por exemplo, o anticorpo humanizado possui L-CDR1, L-CDR2 e L-CDR3, cujas sequências de aminoácidos são: a) SEQ ID NOs: 29, 36 e 43, respectivamente; b) SEQ ID NOs: 29, 37 e 43, respectivamente; c) SEQ ID NOs: 29, 38 e 43, respectivamente; d) SEQ ID NOs: 29, 36 e 43, 20 respectivamente; e) SEQ ID NOs: 29, 39 e 43, respectivamente; f) SEQ ID NOs: 30, 40 e 43, respectivamente; g) SEQ ID NOs: 31, 36 e 44, respectivamente; h) SEQ ID NOs: 31, 36 e 45, respectivamente; i) SEQ ID NOs: 31, 36 e 46, respectivamente; j) SEQ ID NOs: 32, 41 e 47, respectivamente; ou k) SEQ ID NOs: 33, 41 e 48, respectivamente.

30 A invenção refere-se também a uma cadeia pesada humanizada compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,

SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,
 5 SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 294, ou uma combinação destas, em que a cadeia pesada humanizada de imunoglobulina não é a cadeia pesada de Campath®. Por exemplo, o anticorpo humanizado possui H-CDR1, H-CDR2 e H-CDR3, cujas sequências de aminoácidos são: a) SEQ ID NOs: 51, 59, e 69, respectivamente; b)
 10 SEQ ID NOs: 50, 60 e 69, respectivamente; c) SEQ ID NOs: 50, 61 e 68, respectivamente; d) SEQ ID NOs: 50, 61 e 69, respectivamente; e) SEQ ID NOs: 50, 62 e 69, respectivamente; f) SEQ ID NOs: 52, 61 e 70, respectivamente; g) SEQ ID NOs: 53, 63 e 71, respectivamente; h) SEQ ID NOs: 54, 64 e 71, respectivamente; i) SEQ ID NOs: 55, 63 e 72, respectivamente; j)
 15 SEQ ID NOs: 56, 65 e 73, respectivamente; k) SEQ ID NOs: 56, 65 e 294; ou l) SEQ ID NOs: 56, 66 e 74, respectivamente.

Em uma concretização, um anticorpo humanizado desta invenção compreende uma cadeia leve incluindo uma sequência de domínio variável (V_L) de uma das SEQ ID NOs: 102, 138, 145-148, 153-157 e 164-168.
 20 Em uma concretização correlata, o anticorpo humanizado compreende uma cadeia leve cuja sequência de aminoácidos compreende ou consiste em uma das SEQ ID NOs: 273, 275, 278, 280 e 282.

Em uma concretização, um anticorpo humanizado desta invenção compreende uma cadeia pesada incluindo uma sequência de domínio variável (V_H) de uma das SEQ ID NOs: 103, 136, 137, 139-144, 149-152 e 158-163. Em uma concretização correlata, o anticorpo humanizado compreende uma cadeia pesada cuja sequência de aminoácidos compreende ou consiste em uma das SEQ ID NOs: 272, 274, 276, 277, 279 e 281.

Em algumas concretizações um anticorpo humanizado desta invenção compreende uma V_H e uma V_L cujas sequências de aminoácidos compreendem ou consistem em:

- a) SEQ ID NOs: 103 e 102, respectivamente (4B10-H1/K1);

- b) SEQ ID NOs: 136 e 138, respectivamente (7F11-SFD1/K2);
- c) SEQ ID NOs: 137 e 138, respectivamente (7F11-SFD2/K2)
- d) SEQ ID NO: 139 e uma das SEQ ID NOs: 145-148, respectivamente (por exemplo, SEQ ID NOs: 139 e 146, respectivamente (2C3-SFD1/K11); e
- 5 SEQ ID NOs: 139 e 147, respectivamente (2C3-SFD1/K12));
- e) SEQ ID NO: 140 e uma das SEQ ID NOs: 145-148, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 141 e uma das SEQ ID NOs: 145-148, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 142 e uma das SEQ ID NOs: 145-148, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 143 e uma das SEQ ID NOs: 145-148, respectivamente;
- 10 i) SEQ ID NO: 144 e uma das SEQ ID NOs: 145-148, respectivamente;
- j) SEQ ID NO: 149 e uma das SEQ ID NOs: 153-157, respectivamente (por exemplo, SEQ ID NOs: 149 e 155, respectivamente (12G6-SFD1/K11); SEQ ID NOs: 149 e 156, respectivamente (12G6-SFD1/K12); e SEQ ID NOs: 149 e 157, respectivamente (12G6-SFD1/K13));
- 15 k) SEQ ID NO: 150 e uma das SEQ ID NOs: 153-157, respectivamente;
- l) SEQ ID NO: 151 e uma das SEQ ID NOs: 153-157, respectivamente;
- m) SEQ ID NO: 152 e uma das SEQ ID NOs: 153-157, respectivamente;
- n) SEQ ID NO: 158 e uma das SEQ ID NOs: 164-168, respectivamente (por exemplo, SEQ ID NOs: 158 e 165, respectivamente (9D9-H10/K12); e
- 20 SEQ ID NOs: 158 e 166, respectivamente (9D9-H10/K13));
- o) SEQ ID NO: 159 e uma das SEQ ID NOs: 164-168, respectivamente (por exemplo, SEQ ID NOs: 159 e 165, respectivamente (9D9-H11/K12); e SEQ ID NOs: 159 e 166, respectivamente (9D9-H11/K13));
- p) SEQ ID NO: 160 e uma das SEQ ID NOs: 164-168, respectivamente;
- 25 q) SEQ ID NO: 161 e uma das SEQ ID NOs: 164-168, respectivamente (por exemplo, SEQ ID NOs: 161 e 166, respectivamente (9D9-H16/K13));
- r) SEQ ID NO: 162 e uma das SEQ ID NOs: 164-168, respectivamente; ou
- s) SEQ ID NO: 163 e uma das SEQ ID NOs: 164-168, respectivamente (por exemplo, SEQ ID NOs: 163 e 166, respectivamente (9D9-H18/K13)).

30 Os anticorpos incluídos nos parênteses são descritos mais detalhadamente abaixo nos exemplos de trabalho.

Em uma concretização, um anticorpo humanizado desta inven-

ção compreende uma cadeia leve (LC) e uma cadeia pesada (HC) cujas sequências de aminoácidos compreendem ou consistem em a) SEQ ID NOs: 273 e 272, respectivamente; b) SEQ ID NOs: 275 e 274, respectivamente; c) SEQ ID NOs: 278 e 276, respectivamente; d) SEQ ID NOs: 278 e 277, respectivamente; e) SEQ ID NOs: 280 e 279, respectivamente; ou f) SEQ ID NOs: 282 e 281, respectivamente.

5 Esta invenção provê também anticorpos anti-CD52 humana (exceto aqueles, se houver, conhecidos no estado da técnica anterior) que se ligam ao mesmo tempo ou que competem ou competem de modo cruzado com um anticorpo exemplificado no presente. Estes anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanizados, quiméricos ou de camundongo. Por exemplo, a invenção provê anticorpos anti-CD52 humana que se ligam ao mesmo epítopo ou que competem ou competem de modo cruzado com um dos anticorpos de camundongo 8G3, 4F7, 9D9, 11C11, 3G7, 5F7, 12G6, 10 15 23E6, 2C3, 7F11 e 4B10, e versões humanizadas e quiméricas destes anticorpos de camundongo. A capacidade de um anticorpo ligar-se ao mesmo epítopo ou de competir ou de competir de modo cruzado com um anticorpo de referência pode ser determinada como descrito acima. Por exemplo, foi constatado que o epítopo de CD52 ligado pelos anticorpos humanizados 20 25 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K12 inclui os resíduos 7, 8 e 11 na SEQ ID NO: 104, e que o epítopo ligado pelo anticorpo humanizado 9D9-H16/K13 inclui os resíduos 4 e 11 na SEQ ID NO: 104. Portanto, em algumas concretizações, esta invenção provê anticorpos anti-CD52 que se ligam ao mesmo epítopo ou que competem ou competem de modo cruzado com estes anticorpos humanizados.

Se desejado, por exemplo, para fins diagnósticos ou de ensaio (por exemplo, imagens para permitir, por exemplo, monitorar terapias), a imunoglobulina humanizada (por exemplo, seu fragmento de ligação a antígeno) pode compreender um marcador detectável. Marcadores detectáveis adequados e métodos para marcar uma imunoglobulina humanizada ou seu fragmento de ligação a antígeno são bem conhecidos no estado da técnica. Marcadores detectáveis adequados incluem, por exemplo, radioisótopo (por

exemplo, como Índio-111, Tecnécio-99m ou Iodo-131), marcadores emissores de pósitrons (por exemplo, Flúor-19), íons paramagnéticos (por exemplo, Gadolínio (III), Manganês (II)), marcador de epítopo (*tag*), marcador de afinidade (por exemplo, biotina, avidina), marcador de *spin*, enzima, grupo fluorescente ou grupo quimioluminescente. Quando marcadores não são empregados, a formação de complexo (por exemplo, entre imunoglobulina humanizada e CD52 humana) pode ser determinada por ressonância plasmônica de superfície, ELISA, FACS ou outros métodos adequados.

Anticorpos anti-CD52 usados na invenção pode ser também conjugados, por meio de, por exemplo, reações químicas ou modificações genéticas, a outros grupos (por exemplo, grupos de peguilção) que melhoraram a farmacocinética dos anticorpos, tais como meio-vida. Em algumas concretizações, os anticorpos anti-CD52 usados nesta invenção podem ser acoplados a uma citocina adequada por meio de, por exemplo, conjugação química ou modificações genéticas (por exemplo, anexando a sequência de codificação da citocina em quadro (*in frame*) à sequência de codificação do anticorpo, criando com isso uma proteína de fusão anticorpo:citocina).

A invenção refere-se também a imunoconjungados nos quais a imunoglobulina humanizada (por exemplo, seu fragmento de ligação a antígeno) da invenção é acoplada a outro agente terapêutico, tal como composto bioativo (por exemplo, citocinas, superantígenos, agentes citotóxicos e toxinas). Por exemplo, a imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana (por exemplo, seu fragmento de ligação a antígeno) pode ser acoplada a uma proteína biológica, molécula de planta ou de origem bacteriana (ou seu derivado), anticorpo interleucina-2 ou anticorpos contra toxina diftérica.

Imunoglobulinas monoclonais de camundongo

Como descrito neste relatório, imunoglobulinas monoclonais de camundongo tendo especificidade de ligação por CD52 humana foram produzidas. Anticorpos humanizados e quiméricos desta invenção podem ser derivados dos anticorpos monoclonais de camundongo desta invenção. Ou seja, em algumas concretizações, anticorpos humanizados e quiméricos an-

ti-CD52 da invenção compreendem sequências obtidas de um anticorpo monoclonal de camundongo da invenção, tais como uma ou mais sequências de CDR. Uma imunoglobulina monoclonal de camundongo desta invenção compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada com sequências de aminoácidos de CDR que diferem das sequências de aminoácidos de CDR anti-CD52 anticorpos monoclonais de camundongo conhecidos (por exemplo, de CF1D12).

Neste relatório descritivo, o termo "imunoglobulina monoclonal de camundongo" refere-se a uma imunoglobulina contendo CDRs de cadeia leve (L-CDR1, L-CDR2 e L-CDR3) e CDRs de cadeia pesada (H-CDR1, H-CDR2 e H-CDR3) de um anticorpo murino anti-CD52 humana, e regiões *framework* e constantes de origem murina. Imunoglobulinas monoclonais de camundongo são anticorpos homogêneos de especificidade única, preparados, por exemplo, pelo uso da tecnologia de hibridomas ou por métodos de recombinação.

A invenção refere-se às imunoglobulinas monoclonais de camundongo descritas neste relatório, incluindo fragmentos de ligação a抗ígenos (ou seja, partes) das imunoglobulinas monoclonais de camundongo, as cadeias leves das imunoglobulinas monoclonais de camundongo, as cadeias pesadas das imunoglobulinas monoclonais de camundongo e fragmentos destas cadeias pesadas e leves. Em uma concretização específica, o anticorpo monoclonal de camundongo é o 8G3.25.3.5 de camundongo (também denominado GENZ 8G3.25.3.5 ou 8G3), GMA 4G7.F3 de camundongo (também denominado 4G7.F3 ou 4G7), GMA 9D9.A2 de camundongo (também denominado 9D9.A2 ou 9D9), GMA 11C11.C5 de camundongo (também denominado 11C11.C5 ou 11C11), GMA 3G7.E9 de camundongo (também denominado 3G7.E9 ou 3G7), 5F7.1.1.4 de camundongo (também denominado GENZ 5F7.1.1.4 ou 5F7), 12G6.15.1.2 de camundongo (também denominado GENZ 12G6.15.1.2 ou 2G6), 23E6.2.2.1 de camundongo (também denominado GENZ 23E6.2.2.1 ou 23E6), 2C3.3.8.1 de camundongo (também denominado GENZ 2C3.3.8.1 ou 2C3), 7F11.1.9.7 de camundongo (também denominado GENZ 7F11.1.9.7 ou 7F11), ou 4B10.1.2.4 de

camundongo (também denominado GENZ 4B10.1.2.4 ou 4B10). A invenção refere-se a uma imunoglobulina monoclonal madura de camundongo, tal como a imunoglobulina monoclonal de camundongo após processamento para retirada dos peptídeos de sinalização da cadeia pesada e da leve e/ou à imunoglobulina glicosilada. A invenção refere-se também a uma proteína imatura ou precursora, tal como uma cadeia leve de imunoglobulina de camundongo ou uma cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo compreendendo peptídeo de sinalização. A invenção refere-se também a moléculas de ácido nucleico (por exemplo, vetores) que codificam estas proteínas imaturas ou maduras, a células hospedeiras que compreendem tais ácidos nucleicos e a métodos para produzir estas proteínas imaturas e maduras.

A função de ligação de uma imunoglobulina monoclonal de camundongo tendo especificidade de ligação por CD52 humana pode ser detectada usando qualquer método adequado, por exemplo, usando ensaios que monitoram a formação de complexo entre imunoglobulina monoclonal de camundongo e CD52 humana (por exemplo, fração de membrana compreendendo CD52 humana ou célula portando CD52 humana, tal como célula T humana, célula B humana, célula CHO ou célula hospedeira recombinante compreendendo um ácido nucleico codificador de CD52 humana; peptídeo (por exemplo, peptídeo sintético) tendo sequência de aminoácidos de CD52).

A presente invenção provê também partes das imunoglobulinas marinhas que incluem cadeias leves, cadeias pesadas e partes de cadeias leves e pesadas. Estas partes de imunoglobulinas podem ser obtidas ou derivadas de imunoglobulinas (por exemplo, por redução e/ou clivagem); ou ácidos nucleicos que codificam parte de uma imunoglobulina ou sua cadeia tendo a propriedade desejada (por exemplo, ligar-se à CD52 humana, similaridade de sequência), podem ser produzidos e expressos. Estas podem ser preparadas, por exemplo, por síntese *de novo* de parte de imunoglobulinas monoclonais de camundongo compreendendo as partes desejadas (por exemplo, região de ligação a antígeno, CDR, FR, e/ou região C) de origem murina e podem ser produzidas usando ácidos nucleicos sintéticos e/ou re-

combinantes para preparar construtos (por exemplo, cDNA) que codificam a cadeia desejada de imunoglobulina monoclonal. Para preparar parte de uma cadeia, um ou mais códons de parada podem ser introduzidos na posição desejada. Uma sequência codificadora de peptídeo de sinalização pode ser 5 também incorporada no ácido nucleico (por exemplo, durante a síntese, mediante inserção em vetor). Se a sequência natural do peptídeo de sinalização não for disponível, uma sequência de peptídeo de sinalização de outro anticorpo pode ser usada (consultar, por exemplo, Kettleborough, C.A., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991)). Com esses métodos, os métodos aqui descritos ou outros métodos adequados, variantes podem ser rapidamente produzidos.

Em uma concretização, uma imunoglobulina monoclonal de camundongo desta invenção compreende uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 3 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 16; a cadeia leve incluindo 15 SEQ ID NO: 4 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 17; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 5 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 18; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 6 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 19; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 7 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 20; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 8 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 21; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 9 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 22; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 10 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 23; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 11 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 24; uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 12 e uma 20 cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 25; ou uma cadeia leve incluindo SEQ ID NO: 13 e uma cadeia pesada incluindo SEQ ID NO: 26.

Em outra concretização, a invenção refere-se também a um anticorpo monoclonal de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo uma região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, 30 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13; e uma região variável

de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

5 Se desejado, por exemplo, para fins diagnósticos ou de ensaio (por exemplo, imagens para permitir, por exemplo, monitorar terapias), a imunoglobulina monoclonal de camundongo (por exemplo, seu fragmento de ligação a antígeno) pode compreender um marcador detectável. Marcadores detectáveis adequados e métodos para marcar uma imunoglobulina monoclonal de camundongo são bem conhecidos no estado da técnica. Marcadores detectáveis adequados incluem, por exemplo, radioisótopo (por exemplo, como Índio-111, Tecnécio-99m ou Iodo-131), marcadores emissores de pósitrons (por exemplo, Flúor-19), íons paramagnéticos (por exemplo, Gadolínio (III), Manganês (II)), marcador de epítopo (*tag*), marcador de afinidade (por exemplo, biotina, avidina), marcador de *spin*, enzima, grupo fluorescente ou grupo quimioluminescente. Quando marcadores não são empregados, a formação de complexo (por exemplo, entre imunoglobulina monoclonal de camundongo e CD52) pode ser determinada por ressonância plasmônica de superfície ou outros métodos adequados. Todos os métodos e técnicas descritos para anticorpos humanizados desta invenção podem ser usados também no mesmo.

10

15

20

Imunoglobulinas quiméricas

Como descrito neste relatório, imunoglobulinas quiméricas tendo especificidade de ligação por CD52 humana foram produzidas. A imunoglobulina químérica compreende uma cadeia leve químérica e/ou uma cadeia pesada químérica com sequências de aminoácidos que diferem da sequência de aminoácidos de anticorpos químéricos conhecidos com especificidade de ligação por CD52 humana.

Neste relatório descritivo, o termo "imunoglobulina químérica" refere-se a uma proteína recombinante que contém os domínios variáveis, incluindo regiões determinantes de complementaridade (CDRs), de um anticorpo derivado de uma espécie, de preferência de um anticorpo monoclonal

30

murino anti-CD52 humana, enquanto as regiões constantes da molécula do anticorpo são derivadas daquelas de uma espécie diferente, por exemplo, de um anticorpo humano.

A invenção refere-se às imunoglobulinas quiméricas aqui descritas, incluindo fragmentos de ligação a antígeno (ou seja, partes) das imunoglobulinas quiméricas, as cadeias leves quiméricas e as cadeias pesadas quiméricas das imunoglobulinas quiméricas e fragmentos destas cadeias leves e pesadas quiméricas. A invenção refere-se a uma imunoglobulina químérica madura, tal como a imunoglobulina químérica após processamento para retirada dos peptídeos de sinalização da cadeia pesada e da leve e/ou à imunoglobulina glicosilada. A invenção refere-se também a uma proteína imatura ou precursora, tal como uma cadeia pesada químérica compreendendo peptídeo de sinalização. A invenção refere-se também a moléculas de ácido nucleico (por exemplo, vetores) que codificam estas proteínas imaturas ou maduras, a células hospedeiras que compreendem tais ácidos nucleicos e a métodos para produzir estas proteínas imaturas e maduras.

A função de ligação de uma imunoglobulina químérica tendo especificidade de ligação por CD52 humana pode ser detectada usando qualquer método adequado, por exemplo, usando ensaios que monitoram a formação de complexo entre imunoglobulina químérica e CD52 humana (por exemplo, fração de membrana compreendendo CD52 humana ou célula portando CD52 humana, tal como célula T humana, célula B humana, célula CHO ou célula hospedeira recombinante compreendendo um ácido nucleico codificador de CD52 humana; peptídeo (por exemplo, peptídeo sintético) tendo sequência de aminoácidos de CD52).

A presente invenção provê também partes das imunoglobulinas quiméricas que incluem cadeias leves, cadeias pesadas e partes de cadeias leves e pesadas. Estas partes de imunoglobulinas podem ser obtidas ou derivadas de imunoglobulinas (por exemplo, por redução e/ou clivagem), ou ácidos nucleicos que codificam parte de uma imunoglobulina ou sua cadeia tendo a propriedade desejada (por exemplo, ligar-se à CD52 humana, similaridade de sequência) podem ser produzidos e expressos. Estas podem ser

preparadas, por exemplo, por síntese de novo de uma parte. Imunoglobulinas quiméricas compreendendo as partes desejadas (por exemplo, região de ligação a antígeno, CDR, FR, e/ou região C) de origem humana e não humana podem ser preparadas usando ácidos nucleicos sintéticos e/ou recombinantes para preparar construtos (por exemplo, cDNA) que codificam a cadeia químérica desejada. Para preparar parte de uma cadeia, um ou mais códons de parada podem ser introduzidos na posição desejada. Uma sequência de codificação de peptídeo de sinalização pode ser também incorporada no ácido nucleico (por exemplo, durante síntese, mediante inserção em vetor). Se a sequência natural do peptídeo de sinalização não for disponível (por exemplo, tipicamente não presente), uma sequência de peptídeo de sinalização de outro anticorpo pode ser usada (consultar, por exemplo, Kettleborough, C.A., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991)). Com estes métodos, os métodos aqui descritos ou outros métodos adequados, variantes podem ser rapidamente produzidos.

Em uma concretização, uma imunoglobulina químérica desta invenção compreende a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24; a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25; ou a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a um anticorpo quimérico com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo uma sequência de região variável de cadeia leve selecionada a partir do grupo constituído por: a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 3, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 4, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 6, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 7, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 9, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 10, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 11, a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 12 e a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13, e uma sequência de região variável de cadeia pesada selecionada a partir do grupo constituído por: a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 16, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 17, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 18, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 19, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 20, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 21, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 22, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 23, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 24, a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 25 e a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 26.

A invenção refere-se também a uma cadeia leve quimérica compreendendo a região variável de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 13.

A invenção refere-se também a uma cadeia pesada quimérica compreendendo a região variável de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26

Se desejado, por exemplo, para fins diagnósticos ou de ensaio (por exemplo, imagens para permitir, por exemplo, monitorar terapias), a imunoglobulina quimérica (por exemplo, seu fragmento de ligação a antígeno) pode compreender um marcador detectável. Marcadores detectáveis

adequados e métodos para marcar uma imunoglobulina quimérica ou seu fragmento de ligação a antígeno são bem conhecidos no estado da técnica. Marcadores detectáveis adequados incluem, por exemplo, radioisótopo (por exemplo, como Índio-111, Tecnécio-99m ou Iodo-131), marcadores emissores de pósitrons (por exemplo, Flúor-19), íons paramagnéticos (por exemplo, Gadolinio (III), Manganês (II)), marcador de epítopo (*tag*), marcador de afinidade (por exemplo, biotina, avidina), marcador de *spin*, enzima, grupo fluorescente ou grupo quimioluminescente. Quando marcadores não são empregados, a formação de complexo (por exemplo, entre imunoglobulina químérica e CD52 humana) pode ser determinada por ressonância plasmônica de superfície ou outros métodos adequados. Todos os métodos e técnicas adequadas descritas acima para anticorpos humanizados desta invenção podem ser também usados no mesmo.

Ácidos nucleicos e vetores recombinantes

*15 A presente invenção refere-se também a ácidos nucleicos isolados e/ou recombinantes (incluindo, por exemplo, essencialmente puros), compreendendo sequências que codificam uma imunoglobulina humanizada, cadeia leve humanizada, cadeia pesada humanizada, imunoglobulina monoclonal de camundongo, cadeia leve de imunoglobulina de camundongo, cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, imunoglobulina químérica, cadeia leve químérica ou cadeia pesada químérica da presente invenção.

Ácidos nucleicos citados neste relatório descritivo como "isolados" ou "purificados" são ácidos nucleicos que foram separados dos ácidos nucleicos DNA genômico ou RNA celular de sua fonte de origem (por exemplo, como existentes em células ou em mistura de ácidos nucleicos tal como uma biblioteca), e incluem ácidos nucleicos obtidos por métodos aqui descritos ou outros métodos adequados, incluindo ácidos nucleicos essencialmente puros, ácidos nucleicos produzidos por síntese química, por combinações de métodos biológicos e químicos, e ácidos nucleicos recombinantes que são isolados (consultar, por exemplo, Daugherty, B.L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A.P. e J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)).

Ácidos nucleicos citados neste relatório descritivo como "recombinantes" são ácidos nucleicos que foram produzidos pela metodologia de DNA recombinante, incluindo aqueles ácidos nucleicos que são gerados por procedimentos fundamentados em método de recombinação artificial, tal 5 como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e/ou clonagem em vetor usando enzimas de restrição. Ácidos nucleicos "recombinantes" são também aqueles que resultam de eventos de recombinação ocorridos através dos mecanismos naturais de células, mas que são selecionados, depois da introdução às células de ácidos nucleicos desenhados, para possibilitar e tornar provável um evento desejado de recombinação.

A presente invenção refere-se também mais especificamente a ácidos nucleicos isolados e/ou recombinantes, compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma imunoglobulina humanizada, imunoglobulina de camundongo ou imunoglobulina quimérica com especificidade de ligação por CD52 humana (por exemplo, uma imunoglobulina humanizada da presente invenção na qual a parte não humana (por exemplo, as CDRs) é derivada de um anticorpo monoclonal murino anti-CD52, uma imunoglobulina de camundongo da presente invenção; ou uma imunoglobulina quimérica da presente invenção na qual a parte não humana (por exemplo, a 15 V_H e V_L) é derivada de um anticorpo monoclonal murino anti-CD52) ou parte (por exemplo, parte de ligação a antígeno) deste (por exemplo, sua cadeia pesada ou leve).

Ácidos nucleicos da presente invenção podem ser usados para produzir imunoglobulinas humanizadas com especificidade de ligação por 20 CD52 humana, imunoglobulinas de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana e imunoglobulinas quiméricas com especificidade de ligação por CD52 humana. Por exemplo, um ácido nucleico (por exemplo, DNA (tal como cDNA) ou RNA) ou um ou mais ácidos nucleicos codificadores de uma imunoglobulina humanizada, imunoglobulina de camundongo ou 25 imunoglobulina quimérica da presente invenção podem ser incorporados em um construto adequado (por exemplo, vetor recombinante) para manipulação adicional de sequências ou para produção das imunoglobulinas codifi-

cadas em células hospedeiras adequadas.

Construtos ou vetores (por exemplo, vetores de expressão) adequados para a expressão de uma imunoglobulina humanizada com especificidade de ligação por CD52 humana, imunoglobulina de camundongo com especificidade de ligação por CD52 humana ou imunoglobulina quimérica com especificidade de ligação por CD52 humana são também providos. Existe disponível uma variedade de vetores, incluindo vetores que são mantidos em uma cópia única ou múltiplas cópias em uma célula hospedeira ou que se integram no(s) cromossomo(s) da célula hospedeira. Os construtos ou vetores podem ser introduzidos em uma célula hospedeira adequada, e células que expressam uma imunoglobulina humanizada, imunoglobulina de camundongo ou imunoglobulina quimérica da presente invenção podem ser produzidas e mantidas em cultura. Um único vetor ou múltiplos vetores podem ser usados para a expressão de uma imunoglobulina humanizada, imunoglobulina de camundongo ou imunoglobulina quimérica com especificidade de ligação por CD52 humana.

Vetores de expressão adequados, por exemplo, vetores de expressão em célula de mamífero, podem conter também alguns componentes, incluindo, entre outros, um ou mais dos seguintes: origem de replicação, gene marcador selecionável, um ou mais elementos de controle de expressão, tal como elemento de controle transcripcional (por exemplo, promotor, intensificador, terminador) e/ou um ou mais sinais de tradução, sequência de sinalização ou sequência líder para direcionamento à membrana ou secreção. Em um construto ou vetor, uma sequência de peptídeo de sinalização pode ser fornecida pelo construto ou vetor ou por outra fonte. Por exemplo, os sinais transpcionais e/ou traducionais de uma imunoglobulina podem ser usados para direcionar a expressão.

Um promotor pode ser provido para expressão em uma célula hospedeira adequada. Promotores podem ser constitutivos ou induzíveis. Por exemplo, um promoter pode ser ligado operacionalmente a um ácido nucleico codificador de uma imunoglobulina humanizada ou cadeia de imunoglobulina, de tal modo que direcione a expressão do polipeptídeo codifica-

do. Existe disponível uma variedade de promotores adequados para hospedeiros procarióticos (por exemplo, promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*) e eucarióticos (por exemplo, álcool desidrogenase de levedura (ADH1), SV40, CMV). Aqueles versados no estado da técnica serão capazes de selecionar 5 o promotor apropriado para expressão de um anticorpo anti-CD52 ou parte deste da invenção.

Adicionalmente, os vetores (por exemplo, vetores de expressão) compreendem tipicamente um marcador selecionável para seleção de células hospedeiras carregando o vetor e, no caso de vetor replicável, uma origem de replicação. Genes codificando produtos que conferem resistência 10 antibiótica ou a fármacos são marcadores selecionáveis comuns e podem ser usados em células procarióticas (por exemplo, gene de β-lactamase (resistência à ampicilina), gene Tet (resistência à tetraciclina) e eucarióticas (por exemplo, genes de resistência à neomicina (G418 ou geneticina), gpt 15 (ácido micofenólico), ampicilina ou à higromicina)). Genes marcadores de dihidrofolato redutase permitem seleção com metotrexato em uma variedade de hospedeiros. Genes que codificam o produto gênico de marcadores auxotróficos do hospedeiro (por exemplo, LEU2, URA3, HIS3) são frequentemente usados como marcadores selecionáveis em levedura. O uso de vetores 20 virais (por exemplo, baculovírus) ou de fago e de vetores capazes de se integrar no genoma da célula hospedeira, tal como vetores retrovirais são também contemplados.

A invenção refere-se, portanto, a moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam uma imunoglobulina humanizada, cadeia leve humanizada, cadeia pesada humanizada, imunoglobulina de camundongo, cadeia leve de imunoglobulina de camundongo, cadeia pesada de imunoglobulina de camundongo, imunoglobulina quimérica, cadeia leve quimérica ou cadeia pesada quimérica desta invenção. A invenção refere-se também a moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam uma parte de ligação a antígeno 25 das imunoglobulinas e de suas cadeias. Sequências polipeptídicas codificadas pelos ácidos nucleicos desta invenção estão descritas abaixo e nos Exemplos a seguir.

Em algumas concretizações, um ácido nucleico é um vetor desta invenção codificam uma cadeia pesada (ou sua parte de ligação a antígeno) ou uma cadeia leve (ou sua parte de ligação a antígeno) desta invenção. Uma célula hospedeira, contendo o ácido nucleico codificador da cadeia pesada e o ácido nucleico codificador da cadeia leve, pode ser usada para produzir um anticorpo, compreendendo a cadeia pesada e a leve (ou parte de ligação a antígeno do anticorpo). O ácido nucleico codificador da cadeia pesada e o ácido nucleico codificador da cadeia leve podem ser colocados em vetores de expressão separados. Podem ser colocados também em um único vetor de expressão sob o mesmo controle ou diferente de expressão.

Consultar, por exemplo, Cabilly Patente U.S. 6 331 415; Fang Patente U.S. 7 662 623.

Método para produzir imunoglobulinas com especificidade por CD52 humana

Outro aspecto da invenção refere-se a um método para produzir um anticorpo anti-CD52 humana desta invenção. O anticorpo desta invenção pode ser produzido, por exemplo, pela expressão de um ou mais ácidos nucleicos recombinantes, codificadores do anticorpo, em uma célula hospedeira adequada. A célula hospedeira pode ser produzida usando qualquer método adequado. Por exemplo, os construtos de expressão (por exemplo, o único ou mais vetores, por exemplo, vetor de expressão em célula de mamífero) descritos neste relatório podem ser introduzidos em uma célula hospedeira adequada, e a célula resultante pode ser mantida (por exemplo, em cultura, em um animal, em uma planta) em condições adequadas para expressão do(s) construto(s) ou (vetor(es)). Células hospedeiras adequadas podem ser procarióticas, incluindo células bacterianas tais como de *E. coli* (por exemplo, cepa DH5 α TM (Invitrogen, Carlsbad, CA)), *B. subtilis* e/ou de outras bactérias adequadas, eucarióticas, tais como células de fungo ou de levedura (por exemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), ou outras células eucarióticas inferiores, e células de eucariotos superiores tais como aquelas de insetos (por exemplo, células S2 *Drosophila* Schnieder, células Sf9 de insetos (WO 94/26087 (O'Connor), células TN5B1-4 (HIGH 5) de in-

setos (Invitrogen), mamíferos (por exemplo, células COS, tais como COS-1 (Nº de acesso na ATCC: CRL-1650) e COS-7 (Nº de acesso na ATCC: CRL-1651), CHO (por exemplo, Nº de acesso na ATCC: CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. and Chasin, LA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-4220 (1980)), 293 (Nº de acesso na ATCC: CRL-1573), HeLa (Nº de acesso na ATCC: CCL-2), CV1 (Nº de acesso na ATCC: CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., *J. Virol.*, 54:739-749 (1985)), 3T3, 293T (Pear, W. S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:8392-8396 (1993)), células NS0, células SP2/0, células HuT 78 e as semelhantes)), ou de plantas (por exemplo, tabaco, lemna (len-tilha de água) e algas). (Consultar, por exemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993)). Em algumas concretizações, a célula hospedeira não é parte de um organismo multicelular (por exemplo, planta ou animal), por exemplo, é uma célula hospedeira isolada ou é parte de uma cultura celular.

A presente invenção refere-se também a células compreendendo um ácido nucleico, por exemplo, vetor, da invenção (por exemplo, vetor de expressão). Por exemplo, um ácido nucleico (ou seja, um ou mais ácidos nucleicos) codificadores das cadeias pesadas e leves de uma imunoglobulina humanizada, as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina de camundongo ou as cadeias pesadas e leves de uma imunoglobulina quimérica, a referida imunoglobulina tendo especificidade de ligação por CD52 humana, ou um construto (ou seja, um ou mais construtos, por exemplo, um ou mais vetores) compreendendo tais ácidos nucleicos, podem ser introduzidos em uma célula hospedeira adequada por um método apropriado à célula hospedeira selecionada (por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, infecção), com o(s) ácido nucleico(s) sendo ou tornando-se operacionalmente ligado(s) a um ou mais elementos de controle de expressão (por exemplo, em vetor, em construto criado por processos na célula, integrado no genoma da célula hospedeira). As células hospedeiras podem ser mantidas em condições adequadas para expressão (por exemplo, na presença de indutor, meio adequado suplementado com sais, fatores de crescimento, antibiótico,

suplementos nutricionais apropriados, etc.), pelo qual o(s) polipeptídeo(s) codificado(s) é (são) produzido(s). Se desejado, a proteína codificada (por exemplo, imunoglobulina humanizada, imunoglobulina de camundongo, imunoglobulina quimérica) pode ser isolada, por exemplo, das células hospedeiras, meio de cultura ou leite. Este processo abrange a expressão em célula hospedeira (por exemplo, célula de glândula mamária) de um animal ou planta transgênica (por exemplo, tabaco) (consultar, por exemplo, WO 92/03918).

Proteínas de fusão podem ser produzidas, em que uma parte da imunoglobulina (por exemplo, imunoglobulina humanizada; cadeia de imunoglobulina) é ligada a um grupo não imunoglobulina (ou seja, um grupo que não ocorre em imunoglobulinas como encontradas na natureza) em localização N-terminal, localização C-terminal ou interna à proteína de fusão. Por exemplo, algumas concretizações podem ser produzidas pela inserção de um ácido nucleico codificador de sequência(s) de imunoglobulina em vetor de expressão adequado, tal como vetor pET (por exemplo, pET-15b, Novagen), vetor de fago (por exemplo, pCANTAB 5 E, Pharmacia) ou outro vetor (por exemplo, pRIT2T Protein A fusion vector, Pharmacia). O construto resultante pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada para expressão. Quando da expressão, algumas proteínas de fusão podem ser isoladas ou purificadas de lisado celular por meio de uma matriz de afinidade adequada (consultar, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. et al., Eds., Vol. 2, Supl. 26, pág. 16.4.1-16.7.8 (1991)).

A invenção refere-se a uma célula hospedeira que comprehende ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) codificador (es) de uma imunoglobulina aqui provida (por exemplo, imunoglobulina humanizada, cadeia leve humanizada ou cadeia pesada humanizada, imunoglobulina de camundongo, cadeia leve de camundongo ou cadeia pesada de camundongo, imunoglobulina quimérica, cadeia pesada quimérica ou cadeia leve quimérica da invenção). A invenção refere-se também a uma célula hospedeira que comprehende ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) codificador (es) de parte de ligação a antígeno da imunoglobulina ou de suas cadeias. Em algumas concretiza-

ções, a célula hospedeira compreende um vetor recombinante (por exemplo, vetor de expressão, vetor de expressão em célula de mamífero) da invenção como citados neste relatório descritivo.

A invenção refere-se também a um método para preparar uma imunoglobulina ou cadeia polipeptídica de imunoglobulina desta invenção. Em uma concretização, o método compreende manter uma célula hospedeira da invenção como aqui descrita (por exemplo, célula hospedeira que contenha um ou mais ácidos nucleicos isolados que codificam a imunoglobulina ou cadeia polipeptídica (por exemplo, cadeia leve e cadeia pesada, apenas cadeia leve ou apenas cadeia pesada da invenção)) em condições apropriadas para expressão da imunoglobulina ou cadeia polipeptídica. Por exemplo, uma célula hospedeira pode ser cultivada em substrato ou suspensão. Em algumas concretizações, o método compreende ainda a etapa de purificar ou isolar a imunoglobulina ou cadeia polipeptídica.

A invenção refere-se ainda a um método para preparar imunoglobulinas através de exibição em fago. Por exemplo, uma biblioteca de exibição em fago de anticorpos virgens para antígeno de CD52 pode ser investigada. Alternativamente, pode ser usado um método para preparar imunoglobulinas através de seleção guiada (Publicação de Pedido de Patente U.S. 2006-0251658 A1.). Uma biblioteca personalizada construída em torno de, por exemplo, região CDR3 de cadeia pesada fixa (e/ou cadeia leve) de um anticorpo anti-CD52 conhecido pode ser criada. As regiões CDR1 e CDR2 das cadeias pesadas e leves podem ser derivadas de um repertório virgem (Osburn *et al.*, *Methods*, 36:61-68 (2005)). Em uma concretização, ScFvs anti-CD52 podem ser gerados a partir de bibliotecas de ScFv de anticorpos virgens, as quais são usadas para obter anticorpos quiméricos humanos de camundongo com as propriedades desejadas de ligação. Estas bibliotecas podem ser rastreadas para anticorpos com as propriedades desejadas de ligação. Bibliotecas de ScFv de fagos podem ser utilizadas. Por exemplo, ScFvs que reconheçam CD52 humana podem ser isolados a partir de seleção guiada em bibliotecas de scFv, após uma série de ciclos de seleção de CD52 humana recombinante, essencialmente como descrito em Vaughan *et*

al. (1996). Resumidamente, após incubação com a biblioteca, o antígeno imobilizado, pré-acoplado com esferas paramagnéticas e fago ligado, pode ser recuperado por separação magnética, enquanto fago não ligado é removido por lavagem. O fago ligado pode ser resgatado em seguida como descrito por Vaughan *et al.* (1996), e o processo de seleção é repetido.

Em uma concretização específica, é construída uma biblioteca, formada pelo domínio variável completo da cadeia pesada de um anticorpo anti-CD52 fundido em formato de cadeia única a um repertório de regiões variáveis humanas virgens de cadeia leve. Depois da seleção, o conjunto de regiões variáveis humanas de cadeia leve que complementa a região variável de cadeia pesada de camundongo é identificado. Uma biblioteca é então construída, formada pelo repertório de regiões variáveis humanas de cadeia leve, selecionadas acima, fundidas em formato de cadeia única a uma região variável quimérica de cadeia pesada constituída de regiões CDR1 and CDR2 humanas virgens e uma região CDR3 fixa proveniente do domínio variável de cadeia pesada de anticorpo anti-CD52 de camundongo. Depois da seleção de ligantes à CD52, os melhores clones para ligação são selecionados. Cinco das 6 regiões CDR podem ser de origem humana, enquanto a CDR-3, da região variável da cadeia pesada, pode ser idêntica à CDR3 original do domínio variável de cadeia pesada de camundongo.

As seleções podem ser realizadas usando CD52 acoplado à amina de DYNABEADS M-270 (Dynal) de acordo com as recomendações do fabricante. Alternativamente, seleções usando CD52 biotinilada podem ser preparadas usando o reagente hexanoato de succinimidil-6-(biotinamido) específico da amina primária específica, seguindo as instruções do fabricante (EZ link NHS LC Biotin, Pierce).

Os resultados de seleções podem ser testados em preparados periplásmicos em rastreamentos de alto rendimento, com base em ensaios de competição dos scFvs presentes no preparado periplásico para competição pela ligação à CD52.

Amostras capazes de competir nos rastreamentos de alto rendimento podem ser submetidas ao sequenciamento de DNA como descrito em

Vaughan *et al.* (1996) e Osburn *et al.* (1996). Os clones seriam então expressos e purificados em forma de scFvs ou IgGs e avaliados quanto à sua capacidade para ligar-se à CD52, neutralizar CD52 ou uma combinação deste, por exemplo, usando ensaios tais como ensaio de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Preparados de scFV purificado podem ser então preparados como descrito no Exemplo 3 de WO 01/66754. As concentrações proteicas de preparados de scFV purificado foram determinadas usando o método de BCA (Pierce). Abordagens semelhantes podem ser usadas para rastrear um parceiro ideal (a cadeia oposta) de uma cadeia pesada ou leve (ou V_H ou V_L) fixa de imunoglobulina.

Em uma concretização específica, a invenção está direcionada a um método para produzir um hibridoma que secreta um anticorpo monoclonal com especificidade de ligação por CD52 humana, compreendendo administrar linfócitos de camundongo transgênico para CD52 a um camundongo não transgênico tendo a mesma linhagem (por exemplo, CD1) como o camundongo transgênico para CD52 humana, produzindo com isso um camundongo não transgênico imunizado. Esplenócitos do camundongo não transgênico imunizado são colocados em contato com células imortalizadas, produzindo, pelo mesmo, células fundidas, e as células fundidas são mantidas em condições nas quais hibridomas que secretam um anticorpo monoclonal tendo especificidade de ligação por CD52 humana são produzidos, resultando, dessa forma, em hibridoma secretor de anticorpo monoclonal com especificidade de ligação por CD52 humana.

25 Imunoglobulinas contendo grupo de toxina ou toxina

A invenção refere-se também a imunoglobulinas que compreendem um grupo de toxina ou toxina. Grupos adequados de toxina compreendem uma toxina (por exemplo, toxina ativa de superfície, citotoxina). O grupo de toxina ou toxina pode ser ligado ou conjugado à imunoglobulina usando qualquer método adequado. Por exemplo, o grupo de toxina ou toxina pode ser ligado covalentemente à imunoglobulina diretamente ou através de um ligante adequado. Ligantes adequados podem incluir ligantes não cliváveis

ou cliváveis, por exemplo, ligantes cliváveis por pH ou ligantes que compreendem um sítio de clivagem para uma enzima celular (por exemplo, estearases celulares, proteases celulares, tais como catepsina B). É possível usar estes ligantes que podem ser clivados para preparar uma imunoglobulina
5 capaz de liberar um grupo de toxina ou toxina depois que a imunoglobulina é internalizada

Uma variedade de métodos para ligar ou conjugar um grupo de toxina ou toxina a uma imunoglobulina pode ser usada. O método específico selecionado dependerá do grupo de toxina ou toxina e da imunoglobulina a
10 serem ligados ou conjugados. Se desejado, ligantes que contêm grupos funcionais terminais podem ser usados para ligar a imunoglobulina e o grupo de toxina ou toxina. Em geral, a conjugação é obtida reagindo o grupo de toxina ou toxina que contém um grupo funcional reativo (ou é modificado para conter um grupo funcional reativo) com um ligante ou diretamente com uma imunoglobulina.
15 Ligações covalentes são formadas, reagindo um grupo de toxina ou toxina que contém (ou é modificado para conter) um grupo químico ou funcional capaz de, em condições apropriadas, reagir com um segundo grupo químico, formando com isso uma ligação covalente. Se desejado, um grupo químico reativo adequado pode ser adicionado a uma imunoglobulina
20 ou ligante usando qualquer método adequado (Consultar, por exemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Muitas combinações de grupos químicos reativos adequados são conhecidas no estado da técnica, por exemplo, um grupo amina pode reagir com um grupo eletrofílico, como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo,
25 flúor, iodo), N-hidroxisuccinimidil éster (NHS) e os semelhantes. Tióis podem reagir com maleimida, dissulfeto de iodoacetila, acrilolia e piridila, tiol de ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol) e os semelhantes. Um grupo funcional aldeído pode ser acoplado a moléculas contendo amina ou hidrazida, e um grupo azida pode reagir com grupo de fósforo trivalente para formar ligações
30 do tipo fosforamidato ou fosforimida. Métodos adequados para introduzir grupos ativadores em moléculas são conhecidos no estado da técnica (consultar, por exemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic

Press: San Diego, CA (1996)).

Grupos de toxina ou toxinas adequadas incluem, por exemplo, maitansinoide (por exemplo, maitansinol, por exemplo, DM1, DM4), taxano, caliqueamicina, duocarmicina ou seus derivados. O maitansinoide pode ser,

5 por exemplo, maitansinol ou análogo de maitansinol. Exemplos de análogos de maitansinol incluem aqueles com anel aromático modificado (por exemplo, C-19-des-cloro, C-20-des-metoxi, C-20-aciloxi) e aqueles tendo modificações em outras posições (por exemplo, C-9-CH, C-14-alcoximetila, C-14-hidroximetila ou aceloximetila, C-15-hidroxi/aciloxi, C-15-metoxi, C-18-N-10 desmetila, 4,5-desoxi). Maitansinol e análogos de maitansinol estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 5 208 020 e 6 333 410, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência neste pedido de patente. Maitansinol pode ser acoplado a anticorpos e fragmentos de anticorpos usando, por exemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (também conhecido como

15 N-succinimidil 4-(2-piridiltio)pentanoato (ou SPP)), 4-succinimidil-oxicarbonila-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato (SDPB), 2 iminotiolan ou anidrido S-acetilsuccínico. O taxano pode ser, por exemplo, taxol, taxotero ou novo taxano (consultar, por exemplo, WO 01/38318). A caliqueamicina pode ser, por exemplo, bromo-complexo de caliqueamicina

20 (por exemplo, bromo alfa, beta ou gama-complexo), iodo-complexo de caliqueamicina (por exemplo, bromo alfa, beta ou gama-complexo) ou seus análogos e miméticos. Bromo-complexos de caliqueamicina incluem I1-BR, I2-BR, I3-BR, I4-BR, J1-BR, J2-BR e K1-BR. Iodo-complexos de caliqueamicina incluem I1-I, I2-I, I3-I, J1-I, J2-I, L1-I e K1-BR. Caliqueamicina e seus mutantes, análogos e miméticos estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S.

25 N^{os} 4 970 198, 5 264 586, 5 550 246, 5 712 374 e 5 714 586, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência neste pedido de patente. Análogos de duocarmicina (por exemplo, KW-2189, DC88, DC89 CBI-TMI e seus derivados) estão descritos, por exemplo, na Patente U.S. N^o 5 070 092, Patente

30 U.S. N^o 5 187 186, Patente U.S. N^o 5 641 780, Patente U.S. N^o 5 641 780, Patente U.S. N^o 4 923 990 e Patente U.S. N^o 5 101 038, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência neste pedido de patente.

Exemplos de outras toxinas incluem, entre outras, antimetabólicos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, meclorotamina, tioepa cloramficil, CC-1065 (consultar as Patentes US N°s 5 475 092, 5 585 499, 5 846 545), melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina de platina (II) (DDP cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorrubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitamicina, mitomicina, puromicina, antramicina (AMC)), duocarmicina e seus análogos ou derivados e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina, vinblastina, taxol, auristatinas (por exemplo, auristatina E) e maitansinoides e seus análogos ou homólogos).

A toxina pode ser também uma toxina ativa de superfície, tal como uma toxina que seja geradora de radicais livres (por exemplo, grupos de toxina contendo selênio) ou grupo contendo radionuclídeo. Grupos adequados contendo radionuclídeos incluem, por exemplo, grupos que contêm iodo radioativo (131I or 125I), ítrio (90Y), lutécio (177Lu), actínio (225Ac), praseodímio, astatina (211At), rênio (186Re), bismuto (212Bi ou 213Bi), índio (111In), tecnécio (99mTc), fósforo (32P), ródio (188Rh), enxofre (35S), carbono (14C), trítio (3H), cromo (51Cr), cloro (36Cl), cobalto (57Co ou 58Co), ferro (59Fe), selênio (75Se) ou gálio (67Ga).

A toxina pode ser uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo de fontes bacterianas, por exemplo, toxina diftérica, exotoxina de pseudomonas (PE) e proteínas de plantas, por exemplo, a cadeia A de ricina (RTA), as proteínas inativadoras de ribossomo (RIPs) gelonina, proteína antiviral de pokeweed, saporina e dodecanadrona são contempladas para uso como toxinas.

Compostos *antisense* de ácidos nucleicos, criados para ligar, desabilitar, promover degradação ou impedir a produção do mRNA responsável por gerar uma determinada proteína alvo podem ser usados também como toxina. Compostos *antisense* incluem RNA ou DNA *antisense*, de fita

simples ou dupla, oligonucleotídeos ou seus análogos que possam hibridizar-se especificamente com espécies individuais de mRNA e impedir a transcrição e/ou o processamento de RNA da espécie de mRNA e/ou a tradução do polipeptídeo codificado e com isso reduzir a quantidade do respectivo polipeptídeo codificado. Ching, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10006-10010 (1989); Broder, et al., *Ann. Int. Med.* 113: 604-618 (1990); Loreau, et al., *FEBS Letters* 274: 53-56 (1990). Agentes terapêuticos antisense úteis incluem, por exemplo: Veglin TM (VasGene) e OGX-011 (Oncogenix).

Toxinas podem ser também agentes fotoativos. Agentes fotoativos adequados incluem materiais à base de porfirina, tais como porfímero sódico, as porfirinas verdes, clorina E6, o próprio derivado da hematoporfirina, ftalocianinas, etiopurpurinas, texafrina e os semelhantes.

A toxina pode ser anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a um alvo intracelular. Tais anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ser direcionados a compartimentos ou alvos subcelulares definidos. Por exemplo, os anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ligar-se a um alvo intracelular selecionado a partir de erbB2, EGFR, BCR-ABL, p21Ras, Caspase3, Caspase7, Bcl-2, p53, Ciclina E, ATF-1/CREB, HPV16 E7, HP1, collagenases Tipo IV, catepsina L, bem como a outros descritos em Kontermann, R.E., *Methods*, 34:163-170 (2004), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

Métodos e composições terapêuticas

Os anticorpos desta invenção são úteis em imunossupressão e imunoablação. Os anticorpos têm como células que expressam CD52 (por exemplo, células T e B) e reduzem (ou "depletam" neste relatório descritivo) a sua população em um indivíduo em necessidade deste. A depleção de linfócitos pode ser útil para tratar uma variedade de doenças e condições tais como inflamação, doenças autoimunes e câncer (por exemplo, neoplasia maligna de linfócitos (de célula B ou célula T)). Consultar, por exemplo, Reiff, A., *Hematology*, 10(2):79-93 (2005). Exemplos de doenças e condições que podem ser tratadas com os anticorpos ou parte de ligação a antígenos desta invenção incluem, entre outras, esclerose múltipla, lúpus, artrite reumatoide,

doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD), doença intestinal inflamatória, vasculite, doença de Behcet, granulomatose de Wegener, síndrome de Sjogren, uveíte, psoríase, esclerodermia, polimiosite, diabetes tipo I (etiologia autoimune), citopenias autoimunes (por exemplo, neutropenia autoimune,

- 5 PRCA refratária dependente de transfusão) leucemia e linfoma tais como linfoma não Hodgkin com doença em massa e leucemia linfocítica crônica de células B.

Por conseguinte, aspectos desta invenção são métodos para depleção de linfócitos e para tratar inflamação, doença autoimune ou câncer,

- 10 administrando uma quantidade efetiva de um anticorpo da invenção a um indivíduo em necessidade deste (por exemplo, paciente humano portador de doença autoimune, câncer hematológico ou paciente a receber um transplante). O anticorpo pode ser administrado também profilaticamente para prevenir o aparecimento de inflamação ou recidiva de doença autoimune ou
15 câncer. Por exemplo, o anticorpo desta invenção pode ser administrado como parte de um regime de condicionamento para preparar um paciente para transplante (por exemplo, transplante de células-tronco, infusão de células T alogênicas ou transplante de órgão sólido).

Alguns anticorpos anti-CD52 desta invenção são direcionados de preferência contra populações de células CD52+.

Uma possível explicação é que epítopos aos quais estes anticorpos se ligam incluem um ou mais grupos carboidratos na proteína CD52, e estes grupos carboidratos podem ser mais prevalentes em CD52 expressa em um tipo de células em comparação a outro. Por exemplo, foi constatado que o anticorpo 7F11, 5F7, 3G7 e

- 25 11C11 depletam células T em maior medida do que células B. Dessa forma, as versões humanizadas e químéricas destes anticorpos podem ser usadas para tratar neoplasia maligna de células T com efeitos colaterais imunossupressores mais brandos.

Por serem direcionados contra células que expressam CD52, os anticorpos desta invenção podem ser usados também para depletar tipos de células CD52+, além de células T e células B. Por exemplo, estudos demonstraram que leucócitos vasculares (VLC) e monócitos-células mieloides

Tie2+ expressando altos níveis de CD52, promovem angiogênese tumoral e contribuem para resistência do tumor à terapia anti-VEGF. Pulaski et al., *J. Translational Med.* 7:49 (2009). Anticorpos anti-CD52 desta invenção podem, portanto, ser usados para inibir angiogênese tumoral ao se direcionarem contra VLC e monócitos Tie2+. Para tanto, os anticorpos anti-CD52 podem ser administrados por via sistêmica ou localmente em um sítio de neovascularização, tal como sítio tumoral. A terapia com anticorpo anti-CD52 pode ser usada associada ao tratamento padrão de câncer, tal como quimioterapia, cirurgia ou radiação, ou a outra terapia direcionada tal como terapia com anticorpo anti-VEGF. A terapia com anticorpo anti-CD52 pode ser usada para tratar, por exemplo, câncer de mama, câncer de pulmão, glioma, câncer colo-retal e quaisquer outras indicações de anticorpos anti-VEGF. A terapia com anticorpo anti-CD52 pode ser usada também em outras condições de neovascularização, incluindo condições neovasculares não oncológicas.

Anticorpos desta invenção podem ser administrados a um indivíduo (por exemplo, humano) isoladamente ou associado com outro agente (por exemplo, imunossupressor) em terapia combinada. O anticorpo pode ser administrado antes, junto ou subsequentemente à administração do agente adicional. Em algumas concretizações, o agente adicional é, por exemplo, um composto anti-inflamatório, tal como sulfassalazina, outro composto anti-inflamatório não esteroidal ou composto anti-inflamatório esteroide. Em algumas concretizações, o agente adicional é outro anticorpo de depleção linfocitária, tal como outro anticorpo anti-CD52, anticorpo anti-CD20, anticorpo anti-BAFF, anticorpo anti-BAFF-R e os semelhantes. Em algumas concretizações, o agente adicional é, por exemplo, uma citocina (por exemplo, IL-7), anticorpo anti-receptor de citocina ou receptor solúvel, que afete, manipule e/ou aumente o processo de reconstituição ocorrido após a depleção linfocitária mediada por um anticorpo anti-CD52 (consultar, por exemplo, Sportes et al., "Cytokine Therapies". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1182:28-38 (2009)). Em outra concretização, um mimético peptídico sintético pode ser administrado associado com uma imunoglobulina da presente in-

venção.

Estudos demonstraram que a depleção linfocitária por alemtuzumabe é mediada por neutrófilos e células NK (Hu *et al.*, *Immunology* 128:260-270 (2009). Por conseguinte, em uma concretização de terapia combinada, um agente que estimula neutrófilos e células NK pode ser administrado a um paciente, antes, durante ou depois de terapia com anticorpo anti-CD52, para aumentar a terapia com o anticorpo. Estimular neutrófilos e/ou células NK inclui, entre outros, (1) aumentar suas taxas de divisão, (2) aumentar a sua expressão na superfície celular dos receptores Fc correspondentes ao isotipo do anticorpo anti-CD52 (por exemplo, Fc γ RIIIa e Fc γ RIIb, Fc γ RII, Fc γ RI e Fc α RI), (3) mobilizar e aumentar o número de células circulantes, (4) recrutar as células para sítios direcionados (por exemplo, sítios de tumores, inflamação ou dano tecidual), (5) e aumentar a sua atividade citotóxica. Exemplos de agentes que estimulam neutrófilos e/ou células NK incluem, por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócitos-monócitos (GM-CSF) (por exemplo, LEUKINE® ou sargramostima e molgramostima); fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (por exemplo, NEUPOGEN® ou filgrastima, filgrastima peguilada e lenograstima); interferon gama (por exemplo, ACTIMMUNE®); antagonistas do receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) (por exemplo, MOZOBIL™ ou plerixafor); e agonistas do receptor 2 de quimiocina CXC (CXCR2). A contagem de neutrófilos do paciente pode ser monitorada periodicamente para assegurar a eficácia ideal do tratamento. A contagem de neutrófilos do paciente pode ser medida também antes de ser iniciado o tratamento com o anticorpo anti-CD52. A quantidade do estimulador pode ser ajustada com base na contagem de neutrófilos do paciente. Uma dose mais alta do estimulador pode ser usada se o paciente apresentar contagem de neutrófilo inferior à normal. Durante períodos de neutropenia, a qual pode ser causada por tratamento com o anticorpo anti-CD52, uma dose mais alta do estimulador de neutrófilos pode ser também administrada para maximizar o efeito do anticorpo anti-CD52.

Dado que a eficácia da terapia com o anticorpo anti-CD52 é me-

lhorada pela estimulação de neutrófilos e/ou células NK, esta concretização de terapia combinada possibilita o uso de menos anticorpo em um paciente, ao mesmo tempo em que mantida eficácia terapêutica semelhante. O uso de menos anticorpo anti-CD52, mantendo-se a eficácia do tratamento, pode 5 ajudar a reduzir os efeitos colaterais do anticorpo anti-CD52, o que inclui resposta imune no paciente contra o anticorpo administrado, bem como o desenvolvimento de autoimunidade secundária (autoimunidade que surge durante ou depois de tratamento com anticorpo anti-CD52). Esta concretização de terapia combinada é útil também em cenário de oncologia, por exemplo, quando o paciente apresenta neutropenia.

Em outra concretização de terapia combinada, é possível usar um estimulador de células T reguladoras para aumentar a terapia com o anticorpo anti-CD52. Os dados obtidos mostram que anticorpos anti-CD52 depletam células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ em medida muito menor, 10 em comparação a outras células T CD4+. Células T reguladoras (também conhecidas como células "Treg" ou células T supressoras) são células que 15 são capazes de inibir a proliferação e/ou a função de outras células linfoides por meio de mecanismos dependentes de contato ou independentes de contato (por exemplo, produção de citocinas). Vários tipos de células T reguladoras foram descritos, incluindo células T γδ, células T *natural killer* (NKT), 20 células T CD8⁺, células T CD4⁺ e células T CD4⁻CD8⁻ duplo negativas. Consultar, por exemplo, Bach et al., *Immunol.* 3:189-98 (2003). Células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ têm sido citadas como células T reguladoras "naturais"; estas células expressam CD4, CD25 e o fator de transcrição da *Forkhead FoxP3* (*Forkhead box p3*). Portanto, nesta concretização de terapia 25 combinada, é possível administrar um agente que estimula células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ antes, durante ou após a terapia com o anticorpo anti-CD52, para afetar a composição do sistema imune após a depleção linfocitária. O agente pode, por exemplo, ativar estas células T, estabilizar e/ou 30 expandir a população das células, mobilizar e aumentar a circulação das células e/ou recrutar as células para sítios direcionados. Exemplos de tais agentes são rapamicina, TGF- β ativo ou latente (por exemplo, TGF-β1,

TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 e TGF- β 5), IL-10, IL-4, IFN- α , vitamina D3, dexametasona e micofenolato de mofetila (consultar, por exemplo, Barrat *et al.*, *J. Exp. Med.* 195:603-616 (2002); Gregori *et al.*, *J Immunol.* 167: 1945-1953 (2001); Battaglia *et al.*, *Blood* 105: 4743-4748 (2005); Battaglia *et al.*, *J. Immunol.* 177:8338-8347 (2006)).

Nesta invenção, quantidade eficaz de anticorpo anti-CD52 para tratar uma doença é uma quantidade que ajuda o indivíduo tratado a atingir um ou mais desfechos clínicos desejados. Por exemplo, para lúpus (cujas manifestações incluem lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, lúpus eritematoso cutâneo, lúpus no SNC, manifestações cardiovasculares, manifestações pulmonares, manifestações hepáticas, manifestações hematológicas, manifestações gastrointestinais, manifestações musculoesqueléticas, lúpus eritematoso neonatal, lúpus eritematoso sistêmico da infância, lúpus eritematoso induzido por fármaco, síndrome anti-fosfolipídica e síndromes de deficiência de complemento resultando em manifestações lúpicas; consultar, por exemplo, Robert G. Lahita, Editor, *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th Ed., Elsevier Academic Press, 2004), os desfechos clínicos podem ser medidos monitorando-se um sistema orgânico afetado (por exemplo, hematúria e/ou proteinúria em nefrite lúpica) e/ou usando um índice de atividade da doença que oferece um escore composto de gravidade da doença em vários sistemas orgânicos (por exemplo, BILAG, SLAM, SLEDAI, ECLAM). Consultar, por exemplo, Mandl *et al.*, "Monitoring patients with systemic lupus erythematosus" em *Systemic Lupus Erythematosus*, 4^a edição, pág. 619-631, R.G. Lahita, Editor, Elsevier Academic Press, (2004).

Em outro exemplo de doença autoimune, esclerose múltipla (incluindo esclerose múltipla recidivante-remitente, progressiva secundária, progressiva primária e progressiva recidivante ((Lublin *et al.*, *Neurology* 46 (4), 907-11 (1996))), é diagnosticada, por exemplo, pelo histórico de sintomas e exame neurológico com o auxílio de testes tais como imagem por ressonância magnética (MRI), punções espinhais, testes de potencial evocado e análise laboratorial de amostras de sangue. Na MS, o tratamento tem como meta reduzir a frequência e a gravidade de recidivas, prevenir incapacita-

dade decorrente da progressão da doença e promover reparo tecidual (Compston e Coles, 2008). Por conseguinte, uma quantidade de anticorpo anti-CD52 que ajude a ser alcançado um desfecho clínico compatível com esta meta é uma quantidade eficaz de anticorpo para o tratamento.

5 A fim de minimizar o aparecimento de imunogenicidade, o uso de um anticorpo humanizado é preferido para tratar um paciente humano nos métodos e composições terapêuticas desta invenção. Em casos em que a administração repetida não é necessária, pode ser apropriado também administrar um anticorpo quimérico humano de camundongo desta invenção
10 a um paciente humano.

Os anticorpos da invenção podem ser usados para tratar um indivíduo que tenha sido previamente tratado com Campath-1H® e que tenha desenvolvido anticorpos neutralizantes contra Campath-1H® (por exemplo, indivíduo refratário a Campath-1H®). Por exemplo, poderia ser tratado um
15 indivíduo com doença autoimune (por exemplo, esclerose múltipla, lúpus, vasculite) e/ou câncer (por exemplo, leucemia (por exemplo, leucemia linfocítica crônica), linfoma (por exemplo, linfoma não Hodgkin)) que tenha sido tratado previamente com Campath-1H® (por exemplo, com um ou mais ciclos de tratamento com Campath-1H®) e que tenha desenvolvido anticorpos
20 neutralizantes contra Campath-1H® que reduzem a eficácia de tratamento posterior com Campath-1H®. Foi demonstrado que os anticorpos humanizados desta invenção (por exemplo, 2C3, 12G6 e 9D9 humanizados) são capazes de ligar-se à CD52 humana apesar de a presença de anticorpos neutralizantes contra alentuzumabe. Em outra concretização, poderia ser tratado
25 um indivíduo que tenha se tornado refratário ao tratamento com um determinado anticorpo humanizado aqui descrito com um dos outros anticorpos humanizados descritos neste pedido de patente.

O anticorpo desta invenção pode ser administrado em dose unitária única ou doses múltiplas a qualquer momento considerado apropriado
30 por um profissional de saúde. A dose pode ser determinada por métodos conhecidos no estado da técnica e pode depender, por exemplo, da idade, sensibilidade, tolerância e bem-estar geral individual. Uma variedade de vias

de administração pode ser usada, incluindo, mas não necessariamente, entre outras, parenteral (por exemplo, injeção intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutânea), oral (por exemplo, na dieta), local, tópica, inalação (por exemplo, inalação intrabrônquica, intranasal ou oral, gotas intranasais) ou retal, dependendo da doença ou condição a ser tratada. A administração parenteral pode ser um modo preferido de administração.

Em uma concretização, os anticorpos da invenção são administrados a um paciente usando o mesmo regime de dose que Campath-1H® (por exemplo, o regime de administração de Campath-1H® para leucemia linfocítica crônica). Em outra concretização, um anticorpo da invenção é administrado a um paciente com doença autoimune (por exemplo, esclerose múltipla (MS)) em um regime compreendendo administração de um primeiro ciclo do anticorpo, seguido por pelo menos outro ciclo do anticorpo, em que cada ciclo de tratamento compreende 1 - 5 doses que são aplicadas em dias consecutivos e em que cada ciclo de tratamento é separado do ciclo seguinte por pelo menos 1 - 24 meses (por exemplo, 12 meses). Por exemplo, em uma concretização, um paciente com esclerose múltipla é tratado com um primeiro ciclo do anticorpo, compreendendo 5 doses diárias do anticorpo, e é seguido por pelo menos outro ciclo de tratamento com o anticorpo, em que o tratamento ocorre depois de 12 meses do primeiro ciclo, compreendendo 3 doses do anticorpo aplicadas em dias consecutivos. Em outra concretização, um paciente com MS é novamente tratado somente se for observada evidência de atividade renovada de MS (consultar, por exemplo, WO 2008/031626; cujos ensinamentos são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente). Em algumas concretizações, pode ser necessário administrar ciclos mais frequentes de tratamento (por exemplo, a cada quatro meses, a cada seis meses) se pacientes com formas mais avançadas de MS ou formas mais progressivas de outras doenças autoimunes (tais como vasculite; consultar, por exemplo, Walsh *et al.*, *Ann Rheum Dis* 67:1322-1327 (2008)) apresentarem recidiva precocemente após o seu último ciclo de tratamento. Evidência de atividade renovada de MS pode ser

determinada com base no juízo profissional do médico responsável, usando quaisquer meios que possa ter à sua disposição. Existe atualmente uma variedade de técnicas disponíveis para diagnosticar atividade renovada de MS, incluindo, entre outras, recursos clínicos (recidiva ou progressão de deficiência neurológica) ou por imagem por ressonância magnética (MRI) do cérebro ou da medula espinhal. Como bem entendido por especialistas médicos, a atividade da doença detectada por MRI pode ser indicada pela ocorrência de novas lesões cerebrais ou espinhais em imagens ponderadas em T1 (intensificadas ou não) ou em T2 ou pelo aumento do volume destas lesões. 5
Métodos diagnósticos para MS estão em constante evolução, portanto, prevê-se que possam existir métodos adicionais no futuro que detectarão atividade renovada de MS (por exemplo, razão de transferência de magnetização ou espectroscopia por MR). O método diagnóstico específico usado para detectar atividade renovada de MS não representa uma limitação à invenção reivindicada. Em certas concretizações, exames repetidos de MRI são realizados em intervalos fixos depois de um ciclo de tratamento, visando determinar se repetir o tratamento é necessário para qualquer determinado paciente, e o momento ideal para este paciente repetir o tratamento. Em geral, é desejável que o tratamento seja repetido antes que a doença apresente novamente manifestações clínicas.
10
15
20

A formulação variará de acordo com a via de administração selecionada (por exemplo, solução, emulsão). Uma composição apropriada, compreendendo o anticorpo a ser administrado, pode ser preparada em um veículo ou um carreador fisiologicamente aceitável. A composição pode 25
compreender doses múltiplas ou ser uma composição de dose unitária única. Para soluções ou emulsões, carreadores adequados incluem, por exemplo, soluções aquosas ou alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meios tamponados. Veículos parenterais podem incluir solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de 30
sódio, solução de Ringer com lactato ou óleos fixos. Veículos intravenosos podem incluir vários aditivos, conservantes ou reposidores hídricos, de nutrientes ou de eletrólitos (Consultar, em geral, *Remington's Pharmaceutical*

Sciences, 17th Edition, Mack Publishing Co., PA, 1985). Para inalação, o composto pode ser solubilizado e carregado em dispensador adequado para administração (por exemplo, atomizador, nebulizador ou dispensador de aerossol pressurizado).

5 Métodos diagnósticos e composições

As imunoglobulinas da presente invenção são úteis também em uma variedade de processos com aplicações em pesquisa e diagnóstico. Por exemplo, podem ser usadas para detectar, isolar e/ou purificar CD52 humana ou suas variantes (por exemplo, por purificação por afinidade ou outros 10 métodos adequados como citometria de fluxo, por exemplo, para células tais como linfócitos, em suspensão) e para estudar a estrutura (por exemplo, conformação) e a função de CD52 humana. Para aplicações *in vitro*, em que a imunogenicidade do anticorpo não representa preocupação, os anticorpos de camundongo e os quiméricos desta invenção serão úteis, além de anti-15 corpos humanizados.

As imunoglobulinas da presente invenção podem ser usadas em aplicações diagnósticas (por exemplo, *in vitro*, *ex vivo*). Por exemplo, as imunoglobulinas humanizadas da presente invenção podem ser usadas para detectar e/ou medir o nível de CD52 humana em uma amostra (por exemplo, 20 em células que expressam CD52 humana em tecidos ou líquidos corporais, tais como exsudato inflamatório, sangue, soro, líquido intestinal, tecidos portando CD52 humana). Uma amostra (por exemplo, tecido e/ou líquido corporal) pode ser obtida de um indivíduo e uma imunoglobulina aqui descrita pode ser usada em método imunológico adequado para detectar e/ou medir a 25 expressão de CD52 humana, incluindo métodos como citometria de fluxo (por exemplo, para células em suspensão como linfócitos), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), incluindo ensaios de quimioluminescência, radioimunoensaio e imunohistologia.

Em uma concretização, é provido um método para detectar 30 CD52 humana em uma amostra, compreendendo por uma amostra em contacto com uma imunoglobulina da presente invenção em condições adequadas para ligação específica da imunoglobulina à CD52 humana e para detec-

tar complexos anticorpo-CD52 formados. Em uma aplicação do método, as imunoglobulinas aqui descritas podem ser usadas para analisar tecidos normais contra inflamados (por exemplo, de ser humano) quanto à reatividade e/ou a expressão de CD52 humana (por exemplo, por imunohistologia) para 5 detectar associações entre, por exemplo, doença intestinal inflamatória (IBD), doenças autoimunes (como esclerose múltipla e lúpus), câncer (como linfoma não Hodgkin e leucemia linfocítica crônica) ou outras condições e expressão aumentada de CD52 humana (por exemplo, em tecidos afetados). Por conseguinte, as imunoglobulinas da presente invenção permitem métodos 10 imunológicos de avaliação da presença de CD52 humana em tecidos normais e inflamados, por meio dos quais é possível avaliar a presença de doença, o progresso de doença e/ou a eficácia de terapia com anti-CD52 humana no tratamento da doença, por exemplo, doença inflamatória.

Adicionalmente, as imunoglobulinas podem ser usadas para e- 15 xaminar tecidos depois de tratamento para depleção com anticorpo terapêutico anti-CD52 para medir o grau de eficácia da depleção, bem como se a expressão de CD52 foi regulada ou não negativamente (*Rawstrom et al., Br. J. Haem., 107:148-153 (1999)*).

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e 20 científicos usados possuem o mesmo significado como habitualmente entendido por aquele versado no estado da técnica ao qual esta invenção pertence. Métodos exemplares e materiais são descritos abaixo, embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles descritos neste pedido de patente possam ser também usados na prática ou testes da presente invenção. Todas as publicações e outras referências citadas neste relatório 25 descritivo são aqui incorporadas, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, prevalecerá. Embora alguns documentos estejam citados neste pedido de patente, esta citação não constitui admissão de que qualquer um destes documentos faça parte do conhecimento geral comum no 30 estado da técnica. Por todo este pedido de patente e as reivindicações, a palavra "compreender" ou variações como "compreende" ou "compreenden-

do" será entendida de modo a implicar a inclusão de um integrante ou grupo de integrantes declarado, mas não a exclusão de qualquer outro integrante ou grupo de integrantes. Os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos somente, e não se destinam a ser uma limitação.

5 Exemplificação

Exemplo 1: Geração de anticorpos anti-CD52 humana de camundongo

Os anticorpos anti-CD52 humana de camundongo nos exemplos de trabalho seguintes foram gerados imunizando camundongos da linhagem CD1 com esplenócitos de camundongos transgênicos para CD52 humana de origem CD1 (Figura 1A), em que a exibição de CD52 humana sobre a superfície de células B e T de camundongos dos camundongos transgênicos foi verificada por citometria de fluxo. Os camundongos transgênicos e os camundongos imunizados têm a mesma origem (CD1), dessa forma, os esplenócitos dos camundongos transgênicos apresentaram CD52 humana na superfície celular como antígeno único, não próprio em formato nativo, e os camundongos não transgênicos imunizados criaram uma resposta de anticorpo primariamente contra a CD52 humana.

Para coleta de esplenócitos dos camundongos transgênicos para CD52 humana, os camundongos foram sacrificados, os baços foram recolhidos e suspensões de células únicas foram preparadas por passagens através de seringa. Camundongos CD1 foram então imunizados com as células de baço positivas para CD52 humana, 5×10^6 em 100 μL por camundongo, com ou sem Adjuvante Completo de Freund por injeção intraperitoneal (i.p.). Foram aplicadas aos camundongos duas doses de reforço a cada duas semanas, depois da primeira imunização com células de baço positivas para CD52 humana de camundongos transgênicos, 5×10^6 em 100 μL por camundongo com Adjuvante Incompleto de Freund, ip.

Secreções oculares foram coletadas, 100-200 μL por camundongo, em tubos separadores de soro com tampa amarela, de todos os camundongos antes da imunização, para determinar o nível basal de reatividade, e uma semana depois de cada rodada de imunização para determinar resposta imune específica anti-CD52 humana. Camundongos que produzi-

ram níveis altos de reatividade anti-CD52 humana, medidos por FACS, em células CHO K1 construídas para expressarem proteína CD52 humana, mas não em células CHO K1 parentais, foram sacrificados, o sangue foi recolhido e os baços coletados em condições estéreis para gerar hibridomas. Os hibridomas foram gerados usando uma linhagem celular de mieloma não secretora de camundongo, SP2/0 Ag14, ou células de mieloma NS1, como parceiras de fusão, 3-4 dias após a imunização. As células fundidas foram colocadas em meio completo de crescimento, contendo hipoxantina, aminopterina e timidina para gerar hibridomas. Depois de rastrear muitos sobrenadantes de hibridoma, foram selecionados vários clones que produziam anticorpos específicos anti-CD52 humana, os quais foram ainda subclonados para derivar uma população clonal. Clones de hibridomas que produziam anticorpos anti-CD52 humana aumentados em escala para desenvolvimento adicional.

Exemplo 2: Análise por PCR de cadeias pesadas e leves de anticorpos anti-CD52 humana de camundongo

Alguns anticorpos monoclonais anti-CD52 humana de camundongo (Figura 1B) foram identificados, testando sobrenadantes de hibridomas quanto à presença de reatividade anti-CD52 humana. Clones foram selecionados individualmente, e as sequências variáveis de cadeias pesadas e leves de camundongos foram identificadas com clonagem e sequenciamento por PCR. As sequências das cadeias leves são mostradas na Figura 2, em comparação a YTH 34.5 HL (ou seja, Ig kappa de Campath (rato) e anticorpo reagente CF1D12 (CF1D12 Kappa) (Invitrogen Life Science Technologies)). Da mesma forma, as sequências das cadeias pesadas são mostradas na Figura 3, em comparação a YTH 34.5 HL e anticorpo reagente CF1D12.

No total, foram identificadas 10 sequências variáveis únicas de cadeia leve e 11 sequências variáveis de cadeia pesada. Se forem incluídos Campath® e CF1D12, 7 regiões únicas de CDR-1 (Tabela 1), 8 regiões únicas de CDR-2 (Tabela 2) e 7 regiões únicas de CDR-3 (Tabela 3) foram identificadas dentro das cadeias leves de anticorpos anti-CD52 humana.

Tabela 1: Sequências de CDR-1 de cadeia leve

CDR-1 de cadeia leve	Sequência
A	KASQNIIDKYLN (SEQ ID NO: 27)
B	KSSQSLLESDGRTYLN (SEQ ID NO: 28)
C	KSSQSLLSDGKTYLN (SEQ ID NO: 29)
D	KSSQSLLSDGRTYLN (SEQ ID NO: 30)
E	KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 31)
F	RSSQSLVHTNGNSYLH (SEQ ID NO: 32)
G	RSSQSLVHTNGNTYLH (SEQ ID NO: 33)

Tabela 2: Sequências de CDR-2 de cadeia leve

CDR-2 de cadeia leve	Sequência
A	NTNNLQT (SEQ ID NO: 34)
B	LVSNLDS (SEQ ID NO: 35)
C	LVSKLDS (SEQ ID NO: 36)
D	LVSNLGS (SEQ ID NO: 37)
E	LVSALDS (SEQ ID NO: 38)
F	LVSNLNS (SEQ ID NO: 39)
G	LVSHLDS (SEQ ID NO: 40)
H	MVSNRFS (SEQ ID NO: 41)

Tabela 3: Sequências de CDR-3 de cadeia leve

CDR-3 de cadeia leve	Sequência
A	LQHISRPR (SEQ ID NO: 42)
B	WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 43)
C	VQGSHFHT (SEQ ID NO: 44)
D	VQGTRFHT (SEQ ID NO: 45)
E	VQGTHLHT (SEQ ID NO: 46)
F	SQSTHVPFT (SEQ ID NO: 47)
G	SQSAHVPPLT (SEQ ID NO: 48)

5 Se forem incluídos Campath® e CF1D12, no total, 8 regiões CDR-1 únicas (Tabela 4), 10 regiões CDR-2 únicas (Tabela 5) e 8 regiões CDR-3 únicas (Tabela 6) foram identificadas dentro das cadeias pesadas de anticorpos anti-CD52 humana.

Tabela 4: Sequências de CDR-1 de cadeia pesada

CDR-1 de cadeia pesada	Sequência
A	GFTFTDFYMN (SEQ ID NO: 49)
B	GFTFSDAWMD (SEQ ID NO: 50)
C	RFTFSDAWMD (SEQ ID NO: 51)
D	GLTFSDAWMD (SEQ ID NO: 52)
E	GFPFSNYWMN (SEQ ID NO: 53)
F	GFTFNKYWMN (SEQ ID NO: 54)
G	GFTFNTYWMN (SEQ ID NO: 55)
H	GFTFTDYYMS (SEQ ID NO: 56)

Tabela 5: Sequências de CDR-2 de cadeia pesada

CDR-2 de cadeia pesada	Sequência
A	FIRDKAKGYTTEYNPSVKKG (SEQ ID NO: 57)
B	EIRNKAKNHVAYYAESVKKG (SEQ ID NO: 58)
C	EIRNKANNHATYYAESVKKG (SEQ ID NO: 59)
D	EIRNKAKNHVKYYAESVKKG (SEQ ID NO: 60)
E	EIRNKAKNHATYYAESVKKG (SEQ ID NO: 61)
F	EIRKKVNNHATYYAESVKKG (SEQ ID NO: 62)
G	QIRLKSNNYATHYAESVKKG (SEQ ID NO: 63)
H	QIRLKSDNYATHYAESVKKG (SEQ ID NO: 64)
I	FIRNKANGYTTEYNASVKKG (SEQ ID NO: 65)
J	FIRNKANGYTTEYSASVKKG (SEQ ID NO: 66)

Tabela 6: Sequências de CDR-3 de cadeia pesada

CDR-3 de cadeia pesada	Sequência
A	AREGHTAAPFDY (SEQ ID NO: 67)
B	TTLDS (SEQ ID NO: 68)
C	TSLDY (SEQ ID NO: 69)
D	TGLDY (SEQ ID NO: 70)
E	TPIDY (SEQ ID NO: 71)
F	TPVDF (SEQ ID NO: 72)
G	TRYIFFDY (SEQ ID NO: 73)
H	TRYIWFDY (SEQ ID NO: 74)

A associação de regiões CDR específicas de cadeia leve e pesada em 13 diferentes anticorpos anti-CD52 humana é retrada na Tabela 7.

- 5 Tabela 7: Classificação de anticorpos anti-CD52 humana com base na composição de CDR

Nome do clone	CDR-1 de cadeia pesada			Cadeia leve		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3	CDR-1	CDR-2	CDR-3
Campath	A	A	A	A	A	A
CF1D12	B	B	B	B	B	B
8G3.25.3.5	C	C	C	C	C	B
GMA 4G7.F3	B	D	C	C	D	B
GMA 9D9.A2	B	E	B	C	E	B
GMA 11C11.C5	B	E	C	C	C	
GMA 3G7.E9	B	F	C	C	F	
5F7.1.1.4	D	E	D	D	G	
12G6.15.1.2	E	G	E	E	C	
23E6.2.2.1	F	H	E	E	C	
2C3.3.8.1	G	G	F	E	C	E
7F11.1.9.7	H	I	G	F	H	F
4B10.1.2.4	H	J	H	G	H	G

Os clones 8G3.25.3.5, 4G7.F3, 9D9.A2, 11C11.C5, 3G7.E9, 5F7.1.1.4, 12G6.15.1.2, 23E6.2.2.1, 2C3.3.8.1, 7F11.1.9.7 e 4B10.1.2.4 são denominados a seguir 8G3, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7, 5F7, 12G6, 23E6, 2C3,

7F11 e 4B10, respectivamente.

Tabela 7.1: SEQ ID NOs das CDRs dos anticorpos anti-CD52 humana

Nome do clone	Cadeia pesada			Cadeia leve		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3	CDR-1	CDR-2	CDR-3
Campath	49	57	67	27	34	42
CF1D12	50	58	68	28	35	43
8G3	51	59	69	29	36	43
4G7	50	60	69	29	37	43
9D9	50	61	68	29	38	43
11C11	50	61	69	29	36	43
3G7	50	62	69	29	39	43
5F7	52	61	70	30	40	43
12G6	53	63	71	31	36	44
23E6	54	64	71	31	36	45
2C3	55	63	72	31	36	46
7F11	56	65	73	32	41	47
4B10	56	66	74	33	41	48

Exemplo 3: Clonagem de genes de região variável de IgG de camundongo, provenientes de células de hibridoma de camundongo, para gerar anticorpo

5 IgG1 quimérico de camundongo/humano

Células de hibridomas em proliferação ativa e secretando anticorpos foram usadas para isolar RNA, com reagente Trizol (Gibco/BRL) e seguindo o protocolo sugerido do fabricante. RNA foi quantificado mediando OD com Nanodrop, e a integridade do RNA foi determinada por sua corrida em gel ou usando um bioanalisador. RNA total foi transcrita de modo reverse para cDNA, e as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). O cDNA foi gerado usando iniciador (*primer*) BD Sprint PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech) e Oligo(dT), a 0,5 µg/µL (Invitrogen Cat. n° Y01212), e iniciadores *reverse* (situados na região constante das cadeias pesadas e leves), listados numericamente abaixo, a 10 µM, seguindo o protocolo do fabricante. Especificamente, os iniciadores de número 3 (SEQ ID NO: 77), 11 (SEQ ID NO: 85), 19 (SEQ ID NO: 93), 20 (SEQ ID NO: 94) e 21 (SEQ ID NO: 95) foram empregados. A amplificação por PCR das regiões variáveis de cadeia pesada e de leve foi realizada usando cDNA gerado como descrito acima. 1 µL de cDNA foi misturado com o iniciador *forward* e iniciadores *reverse*, a 10 µM, cada para cadeias pesadas e leves, e misturas com super mistura para PCR (Invitrogen) na presença de 2 µL de MgCl₂ a 25 mM. O programa de

PCR foi conduzido nas seguintes etapas: 1) 95 °C por 2 minutos; 2) 95 °C por 30 segundos; 3) 56 °C por 30 segundos; 4) 68 °C por 45 segundos; 5) Etapas 2 a 4 repetidas 25 vezes; 6) 68 °C por 10 minutos e manter a 16 °C. O produto da PCR foi analisado em gel 2% quanto à presença de sequência de região variável produzida com tamanho de aproximadamente 300 - 400 bp, e as bandas apropriadas foram clonadas em Kit de clonagem pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, e a sequência clonada é confirmada, usando iniciadores M13. Iniciadores usados para transcrição reversa e para amplificação por PCR de sequências de cadeia leve e de cadeia pesada são providos.

Iniciadores de cadeia leve

- 1) Lead-ML kappa = 5' ATGGGCWTCAARATGRARWCWCAT 3' (Iniciador *forward* em sequência líder) (SEQ ID NO: 75)
- 2) FR1-ML kappa = 5' GAYATTGTGMTRACMCARKMTCAA 3' (Iniciador *forward* no *framework 1*) (SEQ ID NO: 76)
- 15 3) ML kappa const = 5' ACTGGATGGTGGGAAGATGGA 3' (Iniciador *reverse* em região constante) (SEQ ID NO: 77)
- 4) VK-MK = 5' GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA 3' (Iniciador *forward* no *framework 1*) (SEQ ID NO: 78)
- 20 5) MKC-Const = 5' GGATACAGTTGGTGCAGCATC 3' (Iniciador *reverse* in em região constante) (SEQ ID NO: 79)

Iniciadores de cadeia pesada

- 6) MH-SP-ALT1 = 5' ATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTT 3' (Iniciador *forward* em sequência líder) (SEQ ID NO: 80)
- 25 7) MH-SP-ALT2 = 5' ATGRAATGSASCTGGGYTYWTYCTCT 3' (Iniciador *forward* em sequência líder) (SEQ ID NO: 81)
- 8) MH-FR1 = 5' SAGGTSMARCTGCAGSAGTCT 3' (Iniciador *forward* no *framework 1*) (SEQ ID NO: 82)
- 9) MH-FR1-1 = 5' SAGGTGMAGCTCSWRSARYCSGGG 3' (Iniciador *forward* no *framework 1*) (SEQ ID NO: 83)
- 30 10) MH-J2 = 5' TGAGGAGACTGTGAGAGTGCGGCC 3' (Iniciador *reverse* em região J) (SEQ ID NO: 84)

- 11) MH-gamma-const = 5' AYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC
3' (Iniciador *reverse* em região constante) (SEQ ID NO: 85)
- 12) VH MH1 = 5' SARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3' (Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 86)
- 5 13) VH MH2 = 5' SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG 3' (Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 87)
- 14) VH MH3 = 5' CAGGTTACTCTGAAAGWGTSTG 3' (Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 88)
- 15) VH MH4 = 5' GAGGTCCARCTGCAACARTC 3'(Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 89)
- 10 16) VH MH5 = 5' CAGGTCCAACTVCAGCARCC 3'(Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 90)
- 17) VH MH6 = 5' GAGGTGAASSTGGTGGAATC 3'(Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 91)
- 15 18) VH MH7 = 5' GATGTGAACTTGGAAAGTGTC 3'(Iniciador *forward* no framework 1) (SEQ ID NO: 92)
- 19) IgG1 = 5' ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTGGC 3' (Iniciador *reverse* em região constante de CH1 de IgG1 de camundongo) (SEQ ID NO: 93)
- 20 20) IgG2A = 5' CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA 3' (Iniciador *reverse* em região constante de CH1 de IgG2A de camundongo) (SEQ ID NO: 94)
- 21) IgG2B = 5' AGGGGCCAGTGGATAGAGTGATGG 3' (Iniciador *reverse* em região constante de CH1 de IgG2B de camundongo) (SEQ ID NO: 95)

25 Iniciadores degenerados levaram a algum grau de degeneração na extremidade 5' da região *framework* 1 da cadeia pesada e da cadeia leve. A sequência de consenso de DNA de vários clones independentes de região variável de cadeia pesada e de clones de região variável de cadeia leve foi usada para derivar a sequência de aminoácidos.

30 Anticorpos anti-CD52 quiméricos funcionais foram produzidos unindo as regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve ao DNA codificador da região constante de cadeia pesada de IgG1 humana (sequência

idêntica à encontrada em Campath-1H[®]) e de kappa de cadeia leve humana (sequência idêntica à encontrada em Campath-1H[®]), respectivamente. Para gerar o vetor pCEP4 (Invitrogen) de cadeia leve, codificador de cadeia leve do anticorpo contra CD52, a sequência variável da cadeia leve foi amplificada por PCR e construída por clonagem independente de ligase no vetor de cadeia leve pCEP4 LIC para obter a sequência de sinalização kappa humana na extremidade 5' e a região constante de cadeia leve na extremidade 3'. Do mesmo modo, para gerar o vetor pCEP4 de cadeia pesada, a sequência da região variável da cadeia pesada foi construída por clonagem independente de ligase no vetor de cadeia pesada pCEP4 LIC para obter a sequência de sinalização de cadeia kappa humana na extremidade 5' e a região constante da cadeia pesada, abrangendo as regiões CH1, *hinge*, CH2 e CH3 na extremidade 3'. As sequências de aminoácido das regiões constantes da cadeia pesada e da leve são idênticas às das regiões constantes presentes no anticorpo Campath1H.

Resumidamente, o vetor pCEP4 LIC foi digerido com BfuA1(New England Biolabs-NEB) em tampão apropriado, seguindo as recomendações do fabricante, e depois de concluída a digestão, o vetor foi purificado com o kit de purificação PureLink PCR (Invitrogen). O plasmídeo linearizado foi tratado em seguida com T4 DNA polimerase (New England Biolabs) para gerar extremidades de fita simples e foi usado para clonar o fragmento da região variável. O vetor específico para cadeia pesada pCEP4 LIC foi usado para clonar a região variável de cadeia pesada, e o vetor específico para cadeia leve pCEP4 LIC foi usado para clonar a região variável de cadeia leve. Foi gerado inserto de região variável por PCR, usando o plasmídeo pCR2.1-TOPO contendo a região variável de cadeia pesada ou o plasmídeo pCR2.1-TOPO contendo a região variável de cadeia leve, como modelos, e iniciadores que contém a sequência específica da região variável e saliências (*overhangs*) do vetor. VENT DNA polimerase (New England Biolabs) foi usada para amplificação por PCR do inserto. O inserto amplificado por PCR foi purificado em gel e tratado com T4 DNA polimerase para gerar extremidades de fita única. Vetores preparados para fragmentos dos respectivos insertos

de região variável de cadeia pesada e de cadeia leve foram combinados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e usados para transformar células TOPO10 (Invitrogen), e colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas e a sequência verificada. Os clones pCEP4 de cadeia pesada e pCEP4 de cadeia leve que continham as sequências corretas de cadeia pesada e de cadeia inseridas *in frame* (uma seguida à outra) foram amplificados e usados para produção de proteína. O construto de cadeia pesada foi cotransfetado com o construto correspondente de cadeia leve, em proporção de 1:1, em células HEK293 (Invitrogen) usando o lipídio catiônico LipofectamineTM 2000 (Invitrogen). O meio condicionado foi colhido três dias depois da transfecção, e o anticorpo quimérico foi purificado usando cromatografia com proteína A. Para este método de cromatografia, o meio foi adicionado à proteína A e lavado com 50 volumes da coluna de PBS. O anticorpo quimérico foi eluído com 5 volumes da coluna de ácido cítrico 12,5 M, pH 3,0. O pH do anticorpo eluído foi neutralizado por adição de HEPES 0,5 M. O tampão foi trocado para PBS usando coluna de filtração em gel PD-10.

Exemplo 4: Análise das especificidades por epítopo de anticorpos quiméricos monoclonais anti-CD52 humana

As especificidades por epítopo dos clones foram determinadas avaliando a capacidade dos anticorpos quiméricos se ligarem a um painel de linhagens celulares, construídas para expressar mutantes de CD52 humana (Figura 4), gerados por mutagênese de varredura de alanina. A substituição no anticorpo dos 10 primeiros aminoácidos da região extracelular de 12 aminoácidos de CD52 foi conduzida em cDNA de CD52 humana no vetor de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen), usando o kit de mutagênese sítio-direcionada STRATAGENE QUIKCHANGE II XL. O vetor pcDNA3.1, codificador de sequência do tipo selvagem ou mutante de CD52, teve a sequência verificada e transfetada em células CHO, usando LipofectamineTM, e por seleção em meio contendo G418, para gerar linhagens de células CHO que expressavam CD52 do tipo selvagem ou mutante em alanina. A ligação específica a epítopo de anticorpos quiméricos anti-CD52 humana foi determinada pela ligação dos anticorpos contra as células do tipo selvagem e mu-

tantes que expressavam CD52, medida por FACS. A análise por FACS foi realizada, detectando a ligação de anticorpos quiméricos anti-CD52 usando anticorpo secundário PE-conjugado de cabra anti-humano (Jackson ImmunoResearch Labs). As Figuras 5A-5C mostram a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de anticorpos monoclonais anti-CD52 contra linhagem de células do tipo selvagem e mutantes expressando CD52. Apesar de CD52 ser uma proteína GPI ancorada muito curta de 12 aminoácidos, os resultados de FACS definem claramente que existem três conjuntos de anticorpos:

5 (1) Grupo de ligação a N-terminal (como 4B10); (2) Grupo de ligação no meio (como 4G7, 9D9 e 11C1) e (3) Grupo de ligação em C-terminal (como 10 23E6, 12G6 e 2C3). As especificidades por epítopo dos anticorpos monoclonais anti-CD52 humana (identificados pelos nomes abreviados no final do Exemplo 2) estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8: Características de 11 anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD52 humana

Clone	Isotipo	Especificidade por epítopo
YTH34.5HL de rato	IgG2a	9-10-11-12
CF1D12 de camundongo	IgG3	3-4-5-6-7
8G3.25.3.5	IgG3	Não confirmada
4G7.F3	IgG3	3-4-5-6-7
9D9.A2	IgG3	3-4-5-6-7
11C11.C5	IgG3	1-3-4-5-6-7
3G7.E9	IgG2b	1-3-4-5-6-7
5F7.1.1.4	IgG3	1-3-4-5-6-7-10
12G6.15.1.2	IgG3	7-8-9
23E6.2.2.1	IgG3	7-8-9
2C3.3.8.1	IgG3	7-8-9-10
7F11.1.9.7	IgG1	1-2-3-4-5
4B10.1.2.4	IgG2a	1-2-3-4-5

CD52 é um antígeno extremamente pequeno, mas possui um grupo glicano N-ligado hidrofílico relativamente grande, bem como uma âncora GPI hidrofóbica. Para explorar a possibilidade de que açúcares poderiam constituir todo ou parte de um epítopo reconhecido pelos anticorpos anti-

20 CD52, amostras de CD52, purificadas por afinidade, provenientes de células CHO-CD52 foram tratadas com a endoglicosidase, PNGase-F, para retirar completamente açúcares N-ligados do antígeno. Amostras tratadas e de controle, com tratamento simulado, foram então resolvidas por SDS-PAGE,

analisadas por manchas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen), sondadas com 3 µg/mL finais de cada um dos anticorpos químéricos monoclonais anti-CD52 indicados, e foram subsequentemente, desenvolvidas de acordo com procedimentos padrão para *Western Blotting*, 5 usando detecção intensificada por quimioluminescência. *Blots* (manchas) com Campath-1H® (C1H) e com apenas o anticorpo secundário (2° Alone) foram corridos como controles positivo e negativo, respectivamente, e sondados com cada um dos anticorpos monoclonais (Figura 5D). Os resultados revelaram diferentes preferências de ligação entre os anticorpos por CD52 glicosilada contra desglicosilada. Esta caracterização permite a classificação 10 por categoria dos onze anticorpos em quatro tipos de grupos de ligação:

1. Anticorpos exibindo ligação sem preferência aparente para CD52 glicosilada contra desglicosilada (4G7, 9D9)
2. Anticorpos exibindo ligação específica por CD52 glicosilada (7F11, 15 4B10)
3. Anticorpos exibindo ligação específica para CD52 desglicosilada (8G3)
4. Anticorpos exibindo ligação preferencial por CD52 desglicosilada sobre glicosilada CD52 (12G6, 5F7, 23E6, 2C3, 11C11, 3G7)

Exemplo 5: Atividade CDC de anticorpos químéricos anti-CD52

20 Um ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) foi realizado como descrito abaixo. Resumidamente, células CHO K1, construídas para expressar proteína CD52 (CHO-CD52), foram usadas como células-alvo e marcadas com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C por 1 a 2 horas. As células foram lavadas, ressuspensas com meio X-
25 Vivo e misturadas com anticorpos anti-CD52 humana para concentração final de 2,2 µg/mL. Complemento humano (Sigma) foi adicionado às cavidades experimentais para concentração final de 10%. Depois de 1 a 5 horas de incubação, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação MICROBETA TRILUX (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida incubando as células-alvo apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr 30

incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue: [(contagem por minuto de amostra (c.p.m.) - c.p.m. espontânea) / (c.p.m. total - c.p.m. espontânea)] X 100.

5 Doze diferentes anticorpos quiméricos anti-CD52 (região variável de camundongo e região constante de IgG1 humana) foram testados no ensaio de CDC com complemento humano em células CHO-CD52. O anticorpo humanizado Campath-1H® foi usado como controle positivo. Um controle negativo foi Campath-1H® nulo (mutante de não ligação mínima celular de
 10 Campath-1H® – duas mutações pontuais em região CDR2 de cadeia pesada- alça H2 (K52bD e K53D; Gilliland LK *et al.*, *Journal of Immunology*, 162:3663-3671 (1999)). Os resultados indicam que os anticorpos quiméricos são capazes de mediar morte por CDC em células expressando CD52. Alguns dos anticorpos quiméricos mediaram morte robusta equivalente ou me-
 - 15 lhor do que Campath® (Figura 6).

Exemplo 6: Atividade de ADCC de anticorpos quiméricos anti-CD52

Um ensaio de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) foi realizado como descrito abaixo. Resumidamente, células CHO K1, construídas para expressar proteína CD52 (CHO-CD52), foram usadas como células-alvo e marcadas com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C por 1 a 2 horas. As células foram lavadas, ressuspensas com meio X-Vivo e misturadas com anticorpos anti-CD52 humana para concentração final de 1,1 µg/mL. PBMC humanas foram usadas como células efetoras e adicionadas em proporção de 1:100 célula-alvo para efetora. Depois de incubação de 6 horas durante a noite, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação MICROBETA TRILUX (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida incubando as células-alvo apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue:
 30 [(contagem em amostra por minuto (c.p.m.) - c.p.m. espontânea) / (c.p.m.

total - c.p.m. espontânea)] X 100.

Doze diferentes anticorpos quiméricos anti-CD52 (região variável de camundongo e região constante de IgG1 humana) foram testados no ensaio de ADCC usando PBMC humanas como células efetoras. O anticorpo humanizado Campath-1H® foi usado como controle positivo. Um controle negativo foi Campath-1H® nulo (mutante de não ligação mínima celular de Campath-1H® – duas mutações pontuais em região CDR2 de cadeia pesada- alça H2 (K52bD e K53D; Gilliland, 1999, *supra*)). Os resultados indicam que os anticorpos quiméricos são capazes de mediar morte por ADCC em células expressando CD52. Alguns dos anticorpos quiméricos mediaram morte robusta equivalente ou melhor do que Campath® (Figura 7).

Exemplo 7: Avaliação da ligação de anticorpos quiméricos anti-CD52 contra população de linfócitos definidos

Os anticorpos seguintes conjugados a fluoro cromo foram usados para análise por citometria de fluxo: anti-CD3-FITC, anti-CD27-PE, anti-CD62L-PE Cy5, anti-CD56- PE Cy7, anti-CD16-APC Cy7 (BD Biociênciia, San Diego, CA), anti-CD45RA-ECD (Beckman Coulter), anti-CD19-Pacific Blue, anti-CD4-APC Cy5.5 e anti-CD8 pacific orange (Invitrogen, CA). Todos os anticorpos quiméricos de camundongo anti-CD52 humana, bem como o humanizado Campath-1H® foram conjugados a Alexa flúor 647 (BD Pharmingen). Células mononucleares humanas sadias de sangue periférico foram obtidas de *Buffy Coats* (tubos revestidos) crioconservados ou de células mononucleares separadas de sangue de doadores normais, obtidas de fornecedores comerciais (Bioreclamation, NY, EUA). Para enriquecimento de células mononucleares, sangue periférico humano foi diluído 1:1 com solução salina com tampão fosfato (PBS) estéril, sendo cuidadosamente espalhado em camada sobre Ficoll-hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) e centrifugado por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de interfase de células monocelulares foi coletada e lavada em PBS contendo soro bovino fetal 5% (tampão de FACS). Hemácias contaminantes (RBCs) foram lisadas com solução de lise de RBC (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As células foram ressuspensas em tampão FACS frio, e os resíduos

foram removidos usando filtro de 40 micra. Dez citometrias coloridas de fluxo foram realizadas para avaliar a capacidade de ligação de 9 anticorpos químéricos anti-CD52 humana (4B10, 7F11, 9D9, 5F7, 2C3, 4G7, 23E6, 8G3, 3G7), em comparação ao Campath-1H®.

5 Resumidamente, replicas de 1×10^6 PBMC em tampão FACS foram incubadas com um coquetel de diluições pré-tituladas de anticorpos contra CD3, CD27, CD45RA, CD62L, CD56, CD19, CD8, CD4, CD16 juntamente com um dos 9 anticorpos químéricos anti-CD52 humana (4B10, 7F11, 9D9, 5F7, 2C3, 4G7, 23E6, 8G3, 3G7) por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e fixadas em PBS contendo paraformaldeído 1%. 100.000 eventos das células coradas foram adquiridos em BD LSR-II (BD Biosciences, San Jose, CA), e os dados foram analisados usando o software FlowJo versão 7.2 (Tree Star, Inc, Oregon, EUA). Múltiplos subconjuntos com características fenotípicas distintas foram definidos entre linfócitos B e T, e CD52 demonstrou ser expressa em todos os linfócitos humanos. Dez análises de citometria colorida de fluxo foram realizadas para identificar os subconjuntos de linfócitos, e para avaliar similaridades e as diferenças nas características de ligação de anticorpos anti-CD52 a CD52 de superfície celular em subconjuntos definidos. Usando uma combinação de marcadores, 11 populações celulares fenotipicamente distintas correspondentes às linhagens de células B, T e NK foram primeiramente definidas a partir do *gate* (área delimitada) de linfócitos. A intensidade de coloração que corresponde à capacidade de anticorpos anti-CD52 detectarem expressão de CD52 foi então avaliada. Os histogramas (Figuras 8A-8C) mostram uma comparação do nível de detecção 10 de CD52 com cada anticorpo em populações de linfócitos individuais. Os dados mostram que os anticorpos exibem diferenças significativas em ligação a CD52. O nível de detecção com 4B10, 9D9, 7F11 e Campath-1H® são comparáveis, embora 4B10 mostre constantemente o nível mais alto de detecção 15 do que outros anticorpos, incluindo Campath-1H®, em quase todos os subconjuntos definidos. Por outro lado, o nível de detecção de CD52 com os anticorpos 3G7, 4G7, 8G3 e 23E6 é significativamente 20 mais baixo. Os resultados indicam uma hierarquia dentro dos anticorpos com 25

20

25

30

respeito à sua capacidade para reconhecer CD52 em diferentes populações de células, sendo mais alta com 4B10 e a mais baixa com 3G7. Curiosamente, estas diferenças são menos óbvias em subconjuntos de células efetoras CD4 e mais ainda em células NK, nas quais CD52 parece ser expressa em níveis relativamente mais baixos. As variações nas características de ligação indicam que as propriedades dos anticorpos quiméricos não só diferem significativamente de Campath-1H®, mas refletem também diferenças em propriedades entre os anticorpos.

Exemplo 8: Análise de anticorpos quiméricos anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 humana (7F11, 8G3, 23E6, 12G6, 4B10 e 5F7)

Camundongos transgênicos para CD52 humana foram administrados com Campath® ou anticorpos quiméricos anti-CD52 (7F11, 8G3, 23E6, 12G6, 4B10 e 5F7) para avaliar o nível de depleção de linfócitos. Os camundongos foram injetados por via intraperitoneal com Campath® ou os anticorpos quiméricos anti-CD52, em volume de 100 µL e em dose de 1 mg/kg. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baço foram coletados para determinar o nível de depleção de células B e T. Citometria de fluxo foi utilizada para avaliar os números absolutos de células T *helper*, células T citotóxicas e células B totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Estas populações de linfócitos foram definidas por sua expressão em superfície dos seguintes抗ígenos proteicos: expressão de CD4 identifica a população de células T *helper*; expressão de CD8 identifica a população de células T citotóxicas e expressão de CD19 identifica todas as populações de células B maduras. Um nível significativo de depleção de células T e de B foi observado para os anticorpos 12G6 e 4B10, o qual foi comparável à depleção observada com Campath®. O tratamento com Campath®, o anticorpo químérico 12G6 ou com o anticorpo químérico 4B10 reduziu significativamente células T e B no sangue e no baço de camundongos tratados neste nível de dose. Os anticorpos químéricos 7F11 e 5F7 resultaram em níveis significativos de depleção de células T no sangue e no baço, mas foram menos eficazes em depletar células B nos dois compartimentos. O tratamento com o anticorpo

23E6 resultou em nível moderado de depleção nesta dose, enquanto pouca a nenhuma depleção foi observada com o anticorpo 8G3 de afinidade mais baixa.

As Figuras 9A-9C mostram o nível de células T CD4, células T CD8 e células B CD19 no sangue após 72 horas da administração dos anticorpos quiméricos. As Figuras 10A-10C mostram o nível de células T CD4, células T CD8 e células B CD19 no baço após 72 horas da administração.

Exemplo 9: Análise de anticorpos quiméricos anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 humana (2C3, 3G7, 4B10, 9D9 e 11C11)

Camundongos transgênicos para CD52 humana foram administrados com Campath® ou anticorpos quiméricos anti-CD52 (2C3, 3G7, 4B10, 9D9 e 11C11) para avaliar o nível de depleção de linfócitos. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com Campath® ou os anticorpos quiméricos anti-CD52 em volume de 100 µL e em dose de 1 mg/kg. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baço foram coletados para determinar o nível de depleção de células B e T. Citometria de fluxo foi utilizada para avaliar os números absolutos de células T *helper*, células T citotóxicas e células B totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Estas populações de linfócitos foram definidas pela sua expressão em superfície dos seguintes抗ígenos proteicos: expressão de CD4 identifica a população de células T *helper*; expressão de CD8 identifica a população de células T citotóxicas e expressão de CD19 identifica todas as populações de células B maduras. Um nível significativo de depleção de células T e de B foi observado para vários anticorpos no sangue e no baço. A atividade de depleção para 2C3 e 9D9 foi comparável à observada com Campath® com níveis significativos de depleção de células T CD4 e CD8 e células B CD19. O tratamento com 4B10 químérico resultou também em diminuição significativa nos números de linfócitos no sangue de camundongos transgênicos. Embora o tratamento com o anticorpo químérico 3G7 ou com 11C11 depletasse significativamente células T no sangue, o nível de células B presentes não foi significativamente afetado nesta dose.

As Figuras 11A-11C mostram o nível de células T CD4, células T CD8 e células B CD19 no sangue após 72 horas da administração dos anticorpos quiméricos.

Exemplo 10: Análise da eficácia de anticorpos anti-CD52 (7F11, 4B10 e 5 12G6)

Quarenta camundongos SCID ($n = 8$ por grupo) foram injetados com 1×10^6 células tumorais B104 em volume de 100 μL no flanco direito. No Dia 11 após a injeção de células tumorais, o tratamento iniciou com Campath® ou os anticorpos quiméricos 7F11, 4B10 ou 12G6. Os anticorpos 10 foram administrados uma vez por semana em dose de 10 mg/kg por injeção intraperitoneal durante todo o restante do experimento. Todos os camundongos no grupo não tratado desenvolveram tumores com crescimento progressivo, requerendo o sacrifício com mediana de sobrevida de 29 dias. O tratamento com Campath® resultou em aumento estatisticamente significativo 15 em sobrevida, quando comparado ao grupo não tratado (mediana de sobrevida (MS) de 50 dias e $p < 0,0001$). O tratamento com os anticorpos quiméricos anti-CD52 resultou também em aumento estatisticamente significativo em sobrevida, quando comparado a camundongos não tratados ($p < 0,0001$ para 7F11 e 4B10 e $p = 0,0020$ para 12G6). Com base em taxas de 20 sobrevida, a atividade do anticorpo 7F11 e do 4B10 parece ser maior do que a de Campath® (63% de sobrevida para 7F11 e 75% de sobrevida para 4B10, em comparação a 50% de sobrevida para Campath®). A Figura 12 mostra o percentual de sobrevida dos camundongos após o tratamento.

Exemplo 11: Análise da eficácia de anticorpos anti-CD52 (2C3, 8G3 e 23E6)

Quarenta camundongos SCID ($n = 8$ por grupo) foram injetados com 1×10^6 células tumorais B104 em volume de 100 μL no flanco direito. No Dia 11 após a injeção de células tumorais, o tratamento iniciou com Campath® ou os anticorpos quiméricos 2C3, 8G3 ou 23E6. Os anticorpos 30 foram administrados uma vez por semana em dose de 10 mg/kg por injeção intraperitoneal durante todo o restante do experimento. Todos os camundongos no grupo não tratado desenvolveram tumores com crescimento progressivo, requerendo o sacrifício com mediana de sobrevida de 26 dias. O

tratamento com Campath®, e o anticorpo 23E6 e o 2C3 resultou em aumentos estatisticamente significativos em sobrevida ($p = 0,0025$, $p = 0,0007$ e $p = 0,0002$ respectivamente). A Figura 13 mostra o percentual de sobrevida dos camundongos após o tratamento.

5 **Exemplo 12: Análise da eficácia de anticorpos quiméricos anti-CD52 em modelo de enxerto tumoral (9D9 e 4B10)**

Quarenta camundongos SCID ($n = 8$ por grupo) foram injetados com 1×10^6 células tumorais B104 em volume de $100 \mu\text{L}$ no flanco direito. No Dia 11 após a injeção de células tumorais, o tratamento iniciou com 10 Campath® ou anticorpo quimérico 9D9 ou 4B10. Os anticorpos foram administrados uma vez por semana em dose de 10 mg/kg por injeção intraperitoneal durante todo o restante do experimento. Todos os camundongos no grupo não tratado desenvolveram tumores com crescimento progressivo, requerendo o sacrifício com mediana de sobrevida de 27 dias. O tratamento com Campath® resultou em aumento significativamente estatístico em sobrevida, quando comparado ao grupo não tratado (mediana de sobrevida não atingida e $p < 0,0001$). O tratamento com os anticorpos quiméricos anti-CD52 resultou também em aumento estatisticamente significativo em sobrevida, quando comparado a camundongos não tratados ($p < 0,0001$ para 9D9 e 4B10). A análise estatística das curvas de sobrevida revela que o anticorpo quimérico 9D9 exibiu atividade comparável a Campath® ($p = 0,0675$) neste experimento. A Figura 14 mostra o percentual de sobrevida dos camundongos após o tratamento.

15 **Exemplo 13: Análise da eficácia de anticorpos quiméricos anti-CD52 em modelo de enxerto tumoral (2C3 e 11C11)**

Quarenta camundongos SCID ($n = 8$ por grupo) foram injetados com 1×10^6 células tumorais B104 em volume de $100 \mu\text{L}$ no flanco direito. No Dia 11 após a injeção de células tumorais, o tratamento iniciou com 20 Campath® ou anticorpo quimérico 2C3 ou 11C11. Os anticorpos foram administrados uma vez por semana em dose de 10 mg/kg por injeção intraperitoneal durante todo o restante do experimento. Todos os camundongos no grupo não tratado desenvolveram tumores com crescimento progressivo,

requerendo o sacrifício com mediana de sobrevida de 32 dias. O tratamento com Campath® resultou em aumento significativamente estatístico em sobrevida, quando comparado ao grupo não tratado (mediana de sobrevida não atingida e $p < 0,0001$). O tratamento com os anticorpos químéricos anti-CD52 resultou também em aumento estatisticamente significativo em sobrevida, quando comparado a camundongos não tratados ($p < 0,0001$ para 2C3 e $p = 0,0004$ para 11C11). A análise estatística das curvas de sobrevida revela que o anticorpo químérico 2C3 e o 11C11 exibiram atividade comparável a Campath® ($p = 0,3173$ para 2C3 e $p = 0,9703$ para 11C11). A Figura 15 mostra o percentual de sobrevida dos camundongos após tratamento com Campath®, o anticorpo químérico 2C3 ou com o anticorpo químérico 11C11.

Exemplo 14: Geração e análise do anticorpo humanizado 4B10 anti-CD52

O anticorpo humanizado anti-CD52 humana, 4B10, foi gerado
enxertando as regiões CDR do anticorpo de camundongo 4B10 no *frame-
work* de região variável de um anticorpo humano. As sequências de cadeia
pesada e leve de 4B10 de camundongo foram avaliadas por alinhamento de
sequências à base de rede a fim de identificar uma sequência de *framework*
de cadeia pesada e leve de linhagem germinativa humana que servisse co-
mo aceitadora adequada para o enxerto de CDR (Figura 16). Os resíduos
definindo as regiões CDR por Kabat e IMGT® foram sobrepostos em regiões
framework humanas com alta identidade de sequência para gerar sequên-
cias de cadeia pesada e de leve humanizadas. A inspeção visual e a análise
de sequências das sequências sobrepostas de cadeia leve e pesada de
4B10 foram realizadas para identificar a sequência aceitadora mais adequa-
da. De todas as sequências de linhagem germinativa com alta similaridade,
a sequência da linhagem germinativa de VH3-72, para cadeia pesada, e a
de VK2-A18b para cadeia leve (sequências de linhagem germinativa huma-
na podem ser encontradas no site Internet, descritas na publicação por To-
mlinson, IM, et al., *EMBO J.*, 14(18):4628-4638 (1995); Cook, GP., et al.,
Nature Genetics, 7:162-168 (1994)) foram selecionadas a partir de seu alto
grau de homologia, similaridade de sequência com as regiões framework de
camundongo e para alteração mínima da estrutura em alça de CDRs como a

sequência aceitadora de CDR. As sequências de CDR1, 2, e 3 de cadeia pesada e cadeia leve para 4B10 foram enxertadas em regiões *framework* humanas de VH3-72 e VK2-A18b, respectivamente, para gerar sequências da cadeia pesada humanizada e da cadeia leve humanizada para 4B10 (ilustrado na Figura 17; Figura 110).

Exemplo 15: Avaliação das atividades de ligação de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 4B10

Anticorpos quiméricos e humanizados 4B10 foram produzidos e purificados como descrito no Exemplo 3 e analisados quanto à sua capacidade para ligar-se à linhagem de células B B104, que expressam endogenamente CD52, por FACS. Resumidamente, 2×10^5 células B104 foram incubadas com anticorpo (0,02 µg/mL a 16,7 µg/mL) em PBS contendo soro fetal bovino 5% e soro de cabra 5%. O anticorpo ligado foi detectado com anticorpo secundário de cabra anti-humano marcado com FITC, o qual detectou anticorpos quiméricos ou humanizados anti-CD52. Células marcadas foram analisadas usando sistema FACSCalibur (Becton Dickinson). A Figura 18 mostra o aumento em vezes da média geométrica de intensidade de fluorescência de cada amostra normalizada (dividida) em relação ao da amostra do 2º apenas. As 11 diferentes concentrações (12º ponto no eixo X é o secundário apenas) do anticorpo humanizado e do químérico, usadas no ensaio, são mostradas no eixo X, e o aumento de vezes, em Média Geométrica, da fluorescência média está no eixo Y. Os resultados indicam que o anticorpo humanizado 4B10 ligou-se tão bem ou ligeiramente melhor do que o anticorpo químérico 4B10 a células expressando CD52.

Exemplo 16: Avaliação das atividades de ADCC de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 4B10

Anticorpos humanizados e químéricos 4B10 foram avaliados quanto à sua capacidade para mediar morte por ADCC de células expressando CD52. Um ensaio de ADCC foi realizado como descrito no Exemplo 6. Resumidamente, células CHO K1, construídas para expressar proteína CD52 (CHO-CD52), foram usadas como células-alvo e marcadas com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C por 1 a 2 horas. As

células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI 1640, com FCS 10%, e misturadas com anticorpos químéricos ou anticorpos humanizados 4B10 em várias concentrações variando de 10 µg/mL a 0,01 µg/mL. PBMC humanas foram usadas como células efetoras e adicionadas a uma proporção de 1:50 de células-alvo para efetoras. Depois de 6 horas de incubação durante a noite, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação MICROBETA TRILUX (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida por células-alvas incubadas apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue: [(c.p.m. da amostra - c.p.m. espontâneo) / (c.p.m. total - c.p.m. espontâneo)] X 100.

A Figura 19 ilustra as concentrações de controle, de anticorpos químéricos e de humanizados 4B10, usadas no ensaio (eixo X) e o eixo Y mostra o % de morte específica. Os resultados indicam que o anticorpo humanizado 4B10 mediou morte por ADCC equivalente ou ligeiramente melhor do que o anticorpo químérico 4B10. O controle por isótipo de controle de IgG1 mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.
Exemplo 17: Avaliação das atividades de CDC de anticorpos monoclonais químéricos e humanizados 4B10

Anticorpos humanizados e químéricos 4B10 foram avaliados quanto à sua capacidade para mediar efeito citotóxico sobre células B104 que expressam endogenamente CD52 na presença de complemento humano. O kit CellTiter Glo (Promega) foi usado para determinar as células vivas restantes no ensaio. Resumidamente, células B104 (células-alvo) foram espalhadas a $2,5 \times 10^4$ células/cavidade em uma placa de 96 cavidades e foram misturadas com anticorpos químéricos e anticorpos humanizados 4B10 em várias concentrações variando de 1 µg/mL a 25 µg/mL, e complemento humano para concentração final de 10%. O complemento sozinho sem o anticorpo e o anticorpo sozinho sem o complemento foram usados como controles para determinar o fundo. Depois de três horas de incubação a

- 37°C, as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 1500 rpm, e as células vivas presentes no grânulo foram determinadas usando o ensaio CellTiter Glo. As placas foram lidas em equipamento Envision. A Figura 20 mostra as células vivas presentes no ensaio, medidas com o ensaio CellTiter Glo. Mais 5 uma vez, com as concentrações crescentes do anticorpo humanizado e quimérico 4B10, há diminuição no número de células vivas. Estes resultados sugerem que o anticorpo humanizado teve desempenho tão bom ou ligeiramente melhor do que o anticorpo quimérico 4B10 em morte mediada por CDC de células B104.
- 10 Exemplo 18: Análise de perfil farmacocinético de anticorpos quiméricos e humanizados anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 (12G6, 7F11, 4B10 quimérico e humanizado)
- Camundongos transgênicos para CD52 humana foram administrados com um de Campath®, 12G6, 7F11 e anticorpos quiméricos e humanizados 4B10 anti-CD52 para examinar o nível de depleção de linfócitos. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com um destes anticorpos em volume de 100 µL e dose de 1 mg/kg. Para análise de respostas de anti-anticorpo, 100 µL de sangue foram coletados em tubos separadores de soro, via punção do plexo retro-orbital em 2 horas, 1, 2, 4, 7 e 10 dias após a injeção do anticorpo. Análise por ELISA foi usada para determinar o nível de IgG1 humana circulante em cada amostra de soro. Com base em níveis circulantes de anticorpo, parece haver pouca a nenhuma diferença entre Campath®, 7F11, e as formas quiméricas e humanizadas de 4B10. O anticorpo 12G6 exibiu valores mais baixos de cmax após a injeção, sugerindo que este 15 anticorpo pode ser degradado mais rapidamente. A Figura 21 mostra o perfil farmacocinético de Campath® e dos anticorpos 12G6 (quimérico), 7F11 (quimérico), 4B10 (quimérico) e 4B10 (humanizado).
- 20 Exemplo 19: Análise da atividade de depleção de anticorpos quiméricos e humanizados anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 (4B10 quimérico e humanizado)
- Camundongos transgênicos para CD52 humana foram administrados com Campath® ou o anticorpo quimérico ou humanizado 4B10 anti-

corpo anti-CD52 humana para examinar o nível de depleção de linfócitos. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com Campath® ou o anti-corpo quimérico ou o humanizado 4B10 anti-CD52 humana em volume de 100 µL e dose de 0,1 mg/kg. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados para determinar o nível de depleção de células B e T. Citometria de fluxo foi utilizada para avaliar os números absolutos de células T *helper*, células T citotóxicas e células B totais presentes no sangue periférico circulante dos camundongos transgênicos huCD52. Estas populações de linfócitos foram definidas por sua expressão 5 em superfície dos seguintes抗ígenos proteicos: expressão de CD4 identifica a população de células T *helper*, expressão de CD8 identifica a população de células T citotóxicas e expressão de CD19 identifica todas as populações de células B maduras. A comparação da atividade de depleção 10 no baço revelou que não havia diferença no nível de células T depletadas 15 após administração de Campath® ou das formas químéricas ou humanizadas de 4B10. Devido à dose baixa usada, somente um nível modesto de depleção de células B foi observado no baço. Com base em cada animal, aparentemente o anticorpo humanizado 4B10 é tão bom ou ligeiramente melhor 20 do que Campath® em mediar depleção de linfócitos. As Figuras 22A-22C mostram o nível de células T CD4, células T CD8 e células B CD19 no sangue 25 após 72 horas da administração dos anticorpos químéricos e humanizados.

Exemplo 20: Eficiência relativa de ligação de anticorpos anti-CD52 humana

Os valores de EC₅₀ de anticorpos anti-CD52 selecionados foram estimados usando células CHO construídas para expressar CD52. Células CHO-CD52 foram tratadas com tripsina 0,25%, coletadas e enxaguadas com PBS/FBS 5%. As células então depositadas em placas de 96 cavidades de fundo Redondo em 1E5 células por cavidade. A coloração com anticorpo primário foi efetuada com diluição seriada de 12 pontos (1:2) de cada anticorpo químérico anti-CD52, partindo de 50 µg/mL. Fragmento FAB2 de cabra conjugado com FITC de anti-Fc gama humana a 10 µg/mL (Jackson 30 109-096-098) foi usado como secundário. As células foram lavadas 3 vezes

em PBS/FBS 5% gelado antes e depois de cada incubação. As células foram fixadas com PBS contendo paraformaldeído 2% livre de metanol e avaliadas por citometria de fluxo. Os dados de citometria de fluxo foram analisados usando o software Graph pad Prizm para determinar o valor de EC₅₀ com intervalo de confiança de 95%.

Os dados de ligação (Figura 23) indicam que os novos anticorpos contra CD52 não só apresentam diferentes especificidades por epítopo, como mencionado anteriormente, mas também diferentes características de ligação, como mostrado na tabela fornecida abaixo. Campath-1H® e os anticorpos quimérico 7F11, 4B10, 2C3 e 12G6 revelaram valores relativamente semelhantes de EC₅₀ entre 0,5 a 2,5 µg/mL. O anticorpo quimérico 9D9 mostrou características de ligação ligeiramente diferentes com valor de EC₅₀ em torno de 5 a 7 µg/mL. O anticorpo humanizado 4B10 mostrou características de ligação semelhantes às do anticorpo quimérico 4B10, indicando que o anticorpo humanizado reteve as características de ligação como aquelas do anticorpo quimérico 4B10.

Tabela 9: EC₅₀ (µg/mL)

Clone ID	Média	Desvio padrão
C1H*	1,36	0,46
20 2C3-Chi	1,32	0,33
4B10-Chi	2,18	0,33
4B10-H1/K1	2,23	0,50
7F11-Chi	2,22	0,29
9D9-Chi	6,05	1,18
25 12G6-Chi	0,95	0,21

* C1H refere-se a Campath-1H®.

Exemplo 21: Humanização de clone 7F11 de anti-CD52

A humanização de clone 7F11 de anticorpo anti-CD52 humana foi realizada enxertando as regiões CDR do anticorpo 7F11 de camundongo em framework (arcabouço) de região variável de anticorpo humano, como descrito no Exemplo 14 para humanização do anticorpo 4B10. Sequências de CDR-1, CDR-2 e CDR-3 da cadeia pesada e cadeia leve de 7F11 foram

enxertadas nas regiões *framework* de VH3-72 e VK2 A18b humanos, respectivamente. As sequências JH6 (WGQGTTTVSS: SEQ ID NO: 133) e JK2 (FGQGTKLEIK: SEQ ID NO: 134) humanas foram selecionadas como os peptídeos em C-terminal para cadeias pesadas e leves humanizadas, 5 respectivamente, para gerar sequências de região variável de cadeia pesada humanizada (7F11-SFD1 e 7F11-SFD2) e cadeia leve humanizada (7F11-VK2) para 7F11 (Figura 24). As duas sequências de região variável da cadeia pesada humanizada (7F11-SFD1 e 7F11-SFD2) diferem por um resíduo 10 de aminoácido na região CDR-3. A versão 7F11-SFD1 contém treonina na posição 93 (indicada pelo sistema de numeração de Kabat), enquanto a versão 7F11-SFD2 contém alanina nesta posição. A posição 93 está sublinhada 15 para 7F11-SFD1 e 7F11-SFD2 na Figura 24.

A sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada de 7F11-SFD1 (SEQ ID NO: 274) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve de 7F11-K2 (SEQ ID NO: 275) são mostradas na Figura 107.

Exemplo 22: Avaliação das atividades de ligação de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 7F11

Anticorpos quiméricos e humanizados 7F11 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2) foram produzidos e purificados usando os métodos descritos 20 no Exemplo 3, e analisados quanto à sua capacidade para ligar-se a CD52 expressa na superfície de células CHO-CD52 (células CHO construídas para expressar CD52) por citometria de fluxo. Resumidamente, 2×10^5 células CHO-CD52 foram incubadas com um anticorpo a 10 µg/mL in PBS contendo soro fetal bovino 5% e soro de cabra 5%. Anticorpo ligado foi detectado com 25 um anticorpo secundário anti-humano de cabra marcado com FITC, o qual detectou anticorpos quiméricos ou humanizados anti-CD52. Células marcadas foram analisadas usando sistema FACSCalibur (Becton Dickinson), e os dados foram analisados usando o software FlowJo versão 7.2 (Tree Star, Inc, Oregon, EUA). O histograma na Figura 25 compara os níveis de CD52 30 detectados com anticorpos quiméricos e humanizados 7F11. Os resultados indicam que os anticorpos humanizados 7F11 ligam-se tão bem ou ligeiramente melhor do que o anticorpo químérico 7F11 a células expressando

CD52.

Exemplo 23: Humanização de clone 2C3 de anticorpo anti-CD52

A humanização do clone 2C3 de anticorpo anti-CD52 humana foi realizada enxertando as regiões CDR do anticorpo 2C3 de camundongo em 5 *framework* de região variável de anticorpo humano, como descrito no Exemplo 14 para humanização do clone 4B10 de anticorpo. As sequências de CDR-1, CDR-2 e CDR-3 da cadeia pesada e cadeia leve de 2C3 foram enxertadas em regiões *framework* humanas de VH3-72 e VK2 A18b, respectivamente. As sequências de JH6 (WGQGTTVTVSS: SEQ ID NO: 133) e JK5 10 (FGQGTRLEIK: SEQ ID NO: 135) humanas foram selecionadas como os peptídeos em C-terminal para as cadeias pesadas e leves humanizadas, respectivamente, para gerar sequências de região variável de cadeia pesada humanizada (2C3-SFD1) e cadeia leve humanizada (2C3-VK1) para 2C3 15 (Figuras 26A e B). Diferentemente dos clones humanizados 4B10 e 7F11, a afinidade de ligação do anticorpo humanizado 2C3 com CDR enxertada foi reduzida em grande medida. A afinidade de ligação foi restaurada ao serem introduzidas mutações reversas à estrutura com CDR enxertada, com o objetivo de limitar o número de mutações reversas ao mínimo e manter o anticorpo remoldado tão "humano" quanto possível, reduzindo dessa forma a 20 possibilidade de imunogenicidade. Mutações reversas únicas ou múltiplas foram incorporadas nas sequências de regiões variáveis da cadeia pesada e da leve humanizadas. As posições das mutações reversas (como indicadas pelo sistema de numeração de Kabat) estão retratadas na Tabela 10 e Tabela 11 abaixo. Anticorpos gerados com estas mutações reversas foram avaliados quanto à afinidade de ligação restaurada. Três variantes de cadeia leve 25 (2C3-VK1(L46R), também denominada 2C3-VK11; 2C3-VK1(Y36L-L46R), também denominada 2C3-VK12; e 2C3-VK1(M4I-A19V-Y36L-Q45K-L46R), também denominada 2C3-VK13) e 5 variantes de cadeia pesada (2C3-SFD1(L78V), também denominada 2C3-VH12; 2C3-SFD1(G49A), também denominada 2C3-VH15; 2C3-SFD1(G49A-L78V), também denominada 2C3-VH16; 2C3-SFD1(L18M-G49A-L78V), também denominada 2C3-VH17; e 30 2C3-SFD1(L18M-G42E-G49A-L78V), também denominada 2C3-VH19) fo-

ram gerados usando técnicas padrão de biologia molecular. As sequências de aminoácidos para a sequência de região variável com CDRs enxertadas das cadeias pesadas 2C3-SFD1 e 2C3-VH12, 2C3-VH15, 2C3-VH16, 2C3-VH17 e 2C3-VH19 com mutações reversas são mostradas na Figura 26A, 5 com os aminoácidos revertidos por mutação, sublinhados, e as CDRs mostradas em negrito. Da mesma forma, para as sequências de cadeia leve, a sequência de região variável com CDRs enxertadas de 2C3-VK1 e de 2C3-VK11, 2C3-VK12 e 2C3-VK13 com mutações reversas são mostradas na Figura 26B, com os aminoácidos revertidos por mutação, sublinhados, e as 10 CDRs mostradas em negrito.

A sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada de 2C3-SFD1 (SEQ ID NO: 272) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve de 2C3-K12 (SEQ ID NO: 273) são mostradas na Figura 106.

Tabela 10: Mutantes reversos de cadeia pesada do clone 2C3

Clone ID	Mutação (posição com numeração de Kabat)
2C3-VH12	L a V (78)
2C3-VH15	G a A (49)
2C3-VH16	G a A (49), L a V (78)
2C3-VH17	L a M (18), G a A (49), L a V (78)
2C3-VH19	L a M (18), G a E (42), G a A (49), L a V (78)

15 **Tabela 11:** Mutantes reversos de cadeia leve (kappa) do clone 2C3

Clone ID	Mutação (posição com numeração de Kabat)
2C3-VK11	L a R (46)
2C3-VK12	Y a L (36) and L a R (46)
2C3-VK13	M a I (4), A a V (19), Y a L (36), QL a KR (45,46)

Exemplo 24: Avaliação das atividades de ligação de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 2C3

Anticorpos quiméricos e humanizados 2C3 foram produzidos e purificados usando os métodos descritos no Exemplo 3. Alguns dos anticorpos humanizados produzidos por pareamento de variantes de cadeia pesada com variantes de cadeia leve e um anticorpo químérico correspondente foram analisados por citometria de fluxo quanto à sua capacidade para ligar-se a CD52 expressa na superfície de células CHO-CD52, usando os métodos descritos no Exemplo 22. Os dados de ligação sugerem que clones gerados

por pareamento de variantes de cadeia pesada com variantes de cadeia leve 2C3-VK1 ou 2C3-VK11 apresentaram menor capacidade de ligação, enquanto clones gerados por pareamento de variantes de cadeia pesada com 2C3-VK12 ou 2C3-VK13 exibiram ligação equivalente ou melhor do que a de 5 um anticorpo químérico 2C3. Um histograma representativo de clones selecionados (Figura 27A) compara o nível de CD52 detectado por anticorpos químéricos e humanizados 2C3. A ligação de 2C3-SFD1/K1 é significativamente menor, quando comparada àquela do anticorpo químérico correspondente. A incorporação de um único resíduo de camundongo na posição 46 10 (leucina para arginina) na cadeia leve (resultando em 2C3-VK11) não restaurou a ligação, quando pareada com a cadeia pesada 2C3-SFD1 para produzir o anticorpo 2C3-SFD1/K11. Adicionalmente, a ligação não foi restaurada pela incorporação de três mutações reversas na cadeia pesada (resultando em 2C3-VH17) para produzir o anticorpo 2C3-H17/K11. No entanto, a ligação 15 foi completamente restaurada quando a cadeia pesada 2C3-SFD1 foi pareada com 2C3-VK12, com duas mutações reversas, para produzir o anticorpo 2C3-SFD1/K12, sugerindo que mutações reversas específicas precisam ser incorporadas para restaurar a atividade de ligação. A Figura 27B mostra um histograma de clones humanizados selecionados que demonstram ligação equivalente àquela de um anticorpo químérico 2C3. Esses resultados indicam que a mutação reversa de dois resíduos de aminoácidos na cadeia leve 2C3-VK12 foi suficiente para restaurar completamente a avidez 20 do anticorpo. As alterações nos resíduos 36 (Y para L) e 46 (L para R) possibilaram restaurar a ligação, quando pareados com quase qualquer variante de cadeia pesada. Como, o clone 2C3 humanizado mostrando ligação 25 restaurada com número mínimo de resíduos no *framework*, derivado do anticorpo original do camundongo, é 2C3-SFD1/K12.

Exemplo 25: Humanização de clone 12G6 de anticorpo anti-CD52

A humanização do clone 12G6 de anticorpo anti-CD52 humana 30 foi realizada enxertando as regiões CDR do anticorpo 12G6 de camundongo em um *framework* de região variável de anticorpo humano como descrito no Exemplo 14 para humanização do clone de anticorpo 4B10. Sequências

CDR-1, CDR-2 e CDR-3 da cadeia pesada e cadeia leve de 12G6 foram enxertadas em regiões *framework* humanas de VH3-72 e VK2 A18b, respectivamente. As sequências JH6 (WGQGTTVTVSS: SEQ ID NO: 133) e JK2 (FGQGTKLEIK: SEQ ID NO: 134) humanas foram selecionadas como os peptídeos em C-terminal para as cadeias pesadas e leves humanizadas, respectivamente, para gerar sequências de região variável de cadeia pesada humanizada (12G6-SFD1) e cadeia leve (12G6-VK1) para 12G6 (FIGURAS 28A and 28B). Quando a região variável de cadeia pesada 12G6-SFD1 e a região variável de cadeia leve and 12G6-VK1 foram combinadas no anticorpo 12G6-SFD1/K1 humanizado, a afinidade de ligação por CD52 foi reduzida em grande medida. A afinidade de ligação foi restaurada introduzindo mutações reversas à estrutura enxertada com as CDRs. Mutações reversas únicas e múltiplas foram incorporadas nas sequências de região variável da cadeia pesada humanizada e da cadeia leve humanizada. As posições destas mutações reversas (como indicadas pelo sistema de numeração de Kabat) estão retratadas na Tabela 12 e Tabela 13 abaixo. Anticorpos gerados com estas mutações reversas foram avaliados quanto à afinidade de ligação restaurada. Quatro variantes de cadeia leve (12G6-VK1(Y36V), também denominada 12G6-VK10; 12G6-VK1(Y36V-Q45K-L46R), também denominada 12G6-VK11; 12G6-VK1(Y36V-L46R), também denominada 12G6-VK12; e 12G6-VK1(L46R), também denominada 12G6-VK13) e três variantes de cadeia pesada (12G6-SFD1(L78V), também denominada 12G6-VH10; 12G6-SFD1(G49A), também denominada 12G6-VH11; e 12G6-SFD1(G49A-L78V), também denominada 12G6-VH12) foram geradas usando técnicas padrão de biologia molecular. As sequências de aminoácidos para a região variável enxertada com as CDRs da sequência de cadeia pesada de 12G6-SFD1 e 12G6-VH10, 12G6-VH11 e 12G6-VH12 com mutações reversas são mostradas na Figura 28A com os aminoácidos revertidos por mutação sublinhados, e as regiões de CDRs em negrito. Da mesma forma, para as sequências de cadeia leve, a sequência de região variável com CDRs enxertadas de 12G6-VK1 e de 12G6-VK10, 12G6-VK11, 12G6-VK12 e 12G6-VK13 com mutações reversas são mostradas na Figura 28B com os aminoácidos revertidos.

por mutação sublinhados, e as regiões de CDRs em negrito.

A sequência completa de aminoácidos da cadeia pesada de 12G6-SFD1 (SEQ ID NO: 279) e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve de 12G6-K12 (SEQ ID NO: 280) são mostradas na Figura 109.

5 Tabela 12: Mutantes reversos de cadeia pesada do 12G6

Clone ID	(posição com numeração de Kabat)
12G6-VH10	L a V (78)
12G6-VH11	G a A (49)
12G6-VH12	G a A (49) and L a V (78)

Tabela 13: Mutantes reversos de cadeia leve (kappa) do clone 12G6

Clone ID	(posição com numeração de Kabat)
12G6-VK10	Y a V (36)
12G6-VK11	Y a V (36), QL a KR (45,46)
12G6-VK12	Y a V (36), L a R (46)
12G6-VK13	L a R (46)

Exemplo 26: Avaliação das atividades de ligação de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 12G6

Anticorpos quiméricos e humanizados 12G6 foram produzidos e purificados usando os métodos descritos no Exemplo 3. Alguns dos anticorpos humanizados produzidos por pareamento de variantes de cadeia pesada com variantes de cadeia leve e um anticorpo químérico correspondente foram analisados por citometria de fluxo quanto à sua capacidade para ligar-se a CD52 expressa na superfície de células CHO-CD52, usando os métodos descritos no Exemplo 22. Os dados de ligação sugerem que clones gerados por pareamento de variantes de cadeia pesada com variantes de cadeia leve 12G6-VK1, 12G6-VK10 ou 12G6-VK13 apresentaram menor capacidade de ligação, enquanto clones gerados por pareamento de variantes de cadeia pesada com 12G6-VK11 ou 12G6-VK12 mostraram ligação equivalente ou melhor do que aquela do anticorpo químérico 12G6 correspondente. Um histograma representativo de clones selecionados (Figura 29) compara o nível de CD52 detectado por anticorpos quiméricos e humanizados 12G6. Esses resultados indicam que a mutação reversa de dois resíduos de aminoácido na região variável de cadeia leve de 12G6 (clone 12G6-VK12) foi suficiente para restaurar completamente a especificidade do anticorpo. As alterações

em resíduos numerados por Kabat 36 (Y para V) e 46 (L para R) possibilitaram restaurar a ligação quando pareados com quase qualquer variante de cadeia pesada. Como tal, o clone 12G6 humanizado mostrando ligação restaurada com número mínimo de resíduos no *framework*, derivado do anticorpo original do camundongo, é 12G6-SFD1/K12.

Exemplo 27: Humanização de clone 9D9 de anticorpo anti-CD52

A humanização de clone 9D9 de anticorpo anti-CD52 humana clone 9D9 foi realizada enxertando as regiões CDR do anticorpo 9D9 de camundongo em um *framework* de região variável de anticorpo humano como descrito no Exemplo 14 para humanização do clone de anticorpo 4B10. Sequências CDR-1, CDR-2 e CDR-3 da cadeia pesada e cadeia leve de 9D9 foram enxertadas em regiões *framework* humanas de VH3-23 e VK2 A18b, respectivamente. As sequências de JH6 (WGQGTTVTVSS: SEQ ID NO: 133) e JK2 (FGQGTKLEIK: SEQ ID NO: 134) humanas foram selecionadas como os peptídeos em C-terminal para as cadeias pesadas e leves humanizadas, respectivamente, para gerar sequências de região variável de cadeia pesada humanizada (9D9-VH10) e cadeia leve humanizada (9D9-VK2) (Figuras 30A e 30B). Quando a cadeia pesada 9D9-VH10 e a cadeia leve 9D9-VK2 foram combinadas no anticorpo 9D9-H10/K2 humanizado, a afinidade de ligação por CD52 foi reduzida em grande medida. A afinidade de ligação foi restaurada introduzindo mutações reversas à estrutura enxertada com as CDRs. Mutações reversas únicas e múltiplas foram incorporadas nas sequências de região variável da cadeia pesada humanizada e da cadeia leve humanizada. As posições destas mutações reversas (como indicadas pelo sistema de numeração de Kabat) estão retratadas na Tabela 14 e Tabela 15 abaixo. Anticorpos gerados com estas mutações reversas foram avaliados quanto à afinidade de ligação restaurada. Quatro variantes de cadeia leve (9D9-VK2(Y36L-Q45K-L46R), também denominada 9D9-VK12; 9D9-VK2(Y36L-L46R), também denominada 9D9-VK13; 9D9-VK2(L46R), também denominada 9D9-VK14; e 9D9-VK2(Q45K-L46R), também denominada 9D9-VK15) e cinco variantes de cadeia pesada (9D9-VH10(W47L-V48T-S49A-N76S-L78V), também denominada 9D9-VH11; 9D9-VH10(W47L-

V48T-S49A), também denominada 9D9-VH15; 9D9-VH10(W47L), também denominada 9D9-VH16; 9D9-VH10(W47L-V48T), também denominada 9D9-VH17; e 9D9-VH10(W47L-S49A), também denominada 9D9-VH18) foram geradas usando técnicas padrão de biologia molecular. As sequências de 5 aminoácidos para região variável com CDRs enxertadas da sequência de cadeia pesada 9D9-VH10 e de 9D9-VH11, 9D9-VH15, 9D9-VH16, 9D9-VH17 e 9D9-VH18 com mutações reversas são mostradas na Figura 30A, com os aminoácidos revertidos por mutação sublinhados e as CDRs em negrito. Da mesma forma, para as sequências de cadeia leve, a sequência de 10 região variável enxertadas com CDRs de 9D9-VK2 e de 9D9-VK12, 9D9-VK13, 9D9-VK14 e 9D9-VK15 com mutações reversas são mostradas na Figura 30B com os aminoácidos revertidos por mutação sublinhados e as CDRs em negrito.

As sequências completas de aminoácidos das cadeias pesadas 15 de 9D9-H16 (SEQ ID NO: 276) e 9D9-H18 (SEQ ID NO: 277), e a sequência completa de aminoácidos da cadeia leve de 9D9-K13 (SEQ ID NO: 278) são mostradas na Figura 108.

Tabela 14: Mutantes reversos de cadeia pesada de 9D9

Clone ID	Mutação (posição com numeração de Kabat)
9D9-VH11	WVS a LTA (47-49), N a S (76), L a V (78)
9D9-VH15	WVS a LTA (47-49)
9D9-VH16	W a L (47)
9D9-VH17	WV a LT (47,48)
9D9-VH18	W a L (47) e S a A (49)

Tabela 15: Mutantes reverses de cadeia leve (kappa) de 9D9

Clone ID	Mutação (posição com numeração de Kabat)
9D9-VK12	Y a L (36) e QL a KR (45,46)
9D9-VK13	Y a L (36) e L a R (46)
9D9-VK14	L a R (46)
9D9-VK15	QL a KR (45,46)

20 Exemplo 28: Avaliação das atividades de ligação de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 9D9

Anticorpos quiméricos e humanizados 9D9 foram produzidos e purificados usando os métodos descritos no Exemplo 3. Alguns dos anticorpos humanizados produzidos por pareamento de variantes de cadeia pesada

com variantes de cadeia leve e um anticorpo quimérico correspondente foram analisados por citometria de fluxo quanto à sua capacidade para ligar-se a CD52 expressa na superfície de células CHO-CD52, usando os métodos descritos no Exemplo22. Os dados de ligação sugerem que clones gerados por pareamento de variantes de cadeia pesada com variantes de cadeia leve 9D9-VK2, 9D9-VK14 ou 9D9-VK15 apresentaram menor capacidade de ligação, enquanto clones gerados por pareamento de variantes de cadeia leve 9D9-VK12 ou 9D9-VK13 com variantes de cadeia pesada com mutações reversas 9D9-VH11, 9D9-VH15, 9D9-VH16 e 9D9-VH18 exibiram ligação equivalente ou melhor do que aquela do anticorpo quimérico 9D9 correspondente. Quando variantes de cadeia leve 9D9-VK12 e 9D9-VK13 foram pareados com a cadeia pesada original com CDRs enxertadas 9D9-VH10 ou a sequência 9D9-VH17 com mutação reversa, a ligação foi significativamente reduzida, sugerindo que para clones 9D9 humanizados, tanto sequências de pesada como de cadeia leve deveriam ser construídas com mutações reversas para restaurar a capacidade de ligação. Um histograma representativo de clones selecionados (Figura 31) compara o nível de CD52 detectado por anticorpos quiméricos e humanizados 9D9. Esses resultados indicam que a mutação reversa de dois resíduos de aminoácido (por exemplo, Y para L na posição 36, e L para R na posição 46), na região variável de cadeia leve de 9D9 (clone 9D9-VK13) era necessária para restaurar a especificidade do anticorpo quando pareado com cadeias pesadas alteradas por mutação em uma posição (por exemplo, W para L, na posição 47) ou em duas posições (por exemplo, W para L na posição 47 e S para A na posição 49). Como tais, os clones 9D9 humanizados mostrando ligação restaurada com número mínimo de resíduos no *framework*, derivado do anticorpo original do camundongo, são 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

Exemplo 29: Determinação de eficiência relativa de ligação de anticorpos humanizados anti-CD52 humana

Os valores de EC₅₀ de anticorpos quiméricos e humanizados anti-CD52 foram estimados usando células T CD4+ isoladas de PBMCs de doadores sadios, obtidas de fontes comerciais (Bioreclamation, NY, USA). Cé-

Células T CD4+ foram isoladas por seleção negativa, usando kit EasySep (Stem Cell Technologies). Células T CD4+ isoladas de tecido esplênico de camundongos CE1 transgênicos huCD52 foram usadas também (Stem Cell Technologies) de acordo com os métodos descritos acima no Exemplo 20 para células CHO-CD52. Resumidamente, células T CD4+ humanas foram isoladas de 50 mL do sangue periférico de doadores sadios (Bioreclamation), e células T CD4+ de camundongos transgênicos huCD52 foram isoladas de tecido do baço. As células foram lavadas com PBS/FBS 5% e depositadas em placas de 96 cavidades de fundo redondo em 1×10^5 células por cavidade. A coloração com anticorpo primário foi efetuada com diluição seriada de 8 pontos (1:3) de cada anticorpo quimérico e humanizado anti-CD52, partindo de 100 µg/mL. Um anticorpo secundário de fragmento F(ab')₂ de cabra conjugado com FITC de anti-Fc gamma humano a 10 µg/mL (Jackson 109-096-098) foi usado. As células foram lavadas 3 vezes em PBS/FBS 5% gelado, antes e depois de cada incubação. As células foram fixadas com PBS, contendo paraformaldeído 2% livre de metanol, e avaliadas por citometria de fluxo. Os dados de citometria de fluxo foram analisados com o software GraphPad Prism para determinar valor de EC₅₀ com intervalo de confiança de 95%. Com base na ligação de anticorpos anti-CD52 a células T CD4+ isoladas de PBMCs humanas e a células T CD4+ isoladas de tecido esplênico de camundongos transgênicos para CD52 humana, curvas de ligação (Figuras 32A, 32B, 32C) foram geradas, e valores de EC₅₀ estimados e mostrados na Figura 33. Todos os anticorpos exibiram características semelhantes de ligação a células T CD4+ humanas e a células T CD4+ isoladas de camundongos transgênicos para CD52 humana. Os dados de ligação indicam que os anticorpos humanizados possuem afinidades de ligação equivalentes ou melhores, quando comparadas a seus anticorpos químéricos originais, sugerindo que a afinidade de ligação é retida ou melhorada quando da humanização. Os anticorpos humanizados 2C3 e 12G6 apresentam valores de EC₅₀ pelo menos duas vezes mais baixos do que o anticorpo Campath-1H®, conforme determinado por este ensaio de ligação celular.

Exemplo 30: Avaliação da ligação de anticorpos humanizados anti-CD52 a

uma população definida de linfócitos

Campath-1H® (C1H) e os anticorpos humanizados 2C3 (2C3-SFD1/K12), 9D9 (9D9-H16/ K13 e 9D9-H18/K13) e 12G6 (12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12) foram avaliados quanto a sua ligação a vários subconjuntos de PBMC, em PMBCs de doadores normais, usando os métodos descritos acima no Exemplo 7 para anticorpos quiméricos anti-CD52. Alguns dos anticorpos conjugados a fluorocromo foram usados para análise por citometria de fluxo. Anti-CD27-PE, anti-CD19 e anti-CD11c-PE Cy5, anti-CD56 e anti-CD123-PE Cy7, anti-CD16-APC Cy7 e CD4-APC foram obtidos da BD Biosciences (San Diego, CA), enquanto anti-CD54RA-ECD e anti-HLA-DR-ECD foram obtidos da Beckman Coulter. Anti-CD3-Pacific Blue, anti-CD8 e anti-CD14-Pacific Orange e anti-CD4-APC cy5.5 foram obtidos da Invitrogen (CA). Todos os anticorpos humanizados anti-CD52 humana (9D9-H18/K13, 9D9-H16/K13, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12), bem como o Campath-1H® foram conjugados a FITC. Células mononucleares humanas sadias de sangue periférico foram obtidas a partir de *Buffy Coats* crioconservados ou de células mononucleares separadas do sangue de doadores normais, obtidos de fornecedores comerciais (Bioreclamation, NY, EUA), conforme descrito acima no Exemplo 7. Para enriquecimento de células mononucleares, sangue periférico humano foi diluído 1:1 com solução salina com tampão fosfato (PBS) estéril e foi cuidadosamente espalhado sobre Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) e centrifugado por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de interfase de células mononucleares foi coletada e lavada em PBS contendo soro fetal bovino 5% (tampão FACS). Hemácias contaminantes (RBCs) foram lisadas com solução de lise de RBC (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As células foram ressuspensas em tampão FACS frio, e os resíduos foram retiradas usando filtro de 40 µm. Citometria de fluxo multicolorida foi realizada para avaliar a capacidade de ligação de anticorpos humanizados anti-CD52 humana 2C3 (2C3-SFD1/K12), 9D9 (9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13) e 12G6 (12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12), em comparação a Campath-1H®.

Resumidamente, réplicas de 1×10^6 PBMCs em tampão FACS

foram incubadas com coquetéis pré-titulados de anticorpos para examinar linfócitos e células derivadas de mieloide. O coquetel para linfócitos compreendeu anticorpos contra CD3, CD27, CD45RA, CD56, CD19, CD8, CD4 e CD16. O coquetel de anticorpos para definir populações de mieloides incluiu 5 anticorpos contra HLA-DR, CD11c, CD123, CD4 e CD14. Em cada um dos coquetéis, um dos anticorpos anti-CD52 estava incluído em concentração de 10 µg/mL. As células foram coradas por 30 minutos a 4 °C e lavadas e fixadas em PBS contendo paraformaldeído 10%. 100.000 eventos das células coradas foram adquiridos em citômetro de fluxo BD LSR II (BD Biosciences, 10 San Jose, CA), e os dados foram analisados usando o software FlowJo versão 7.2 (Tree Star, Inc, Oregon, EUA). Múltiplos subconjuntos com características fenotípicas distintas foram definidos entre linfócitos B e T, e CD52 demonstrou ser expressa em todos os linfócitos humanos. A análise por citometria de fluxo multicolorida foi realizada para identificar os subconjuntos 15 de linfócitos e para avaliar similaridades e diferenças nas características de ligação dos anticorpos humanizados anti-CD52 a CD52 de superfície celular em subconjuntos definidos. Usando uma combinação de marcadores, populações celulares fenotipicamente distintas, correspondendo a linhagens de células B, T, NK e apresentadoras de antígeno foram primeiramente definidas. 20 A intensidade de coloração, que corresponde à capacidade de anticorpos humanizados anti-CD52 detectarem expressão de CD52 em cada uma das populações celulares definidas, foi avaliada e comparada à de Campath-1H®. Os histogramas (Figura 34) comparam o nível de CD52 detectado por cada anticorpo em populações individuais. Os resultados indicam que todos 25 os anticorpos humanizados anti-CD52 ligam-se à CD52 na superfície celular em medida semelhante. Adicionalmente, não foram observadas diferenças entre Campath-1H® e anticorpos humanizados anti-CD52 com respeito ao nível de detecção de CD52 na superfície celular. A análise foi realizada em seis diferentes doadores. Dados representativos gerados usando células 30 derivadas de um doador são mostrados na Figura 34. Um padrão semelhante de ligação foi observado com células de outros doadores.

Exemplo 31: Avaliação das atividades de ADCC de anticorpos monoclonais

quiméricos e humanizados 7F11

Anticorpos humanizados e quiméricos 7F11 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar morte por ADCC de células expressando CD52. Um ensaio de ADCC foi realizado usando os métodos descritos acima no Exemplo 6. Resumidamente, células CHO K1 construídas para expressar proteína CD52 (CHO-CD52) foram usadas como células-alvo. As células-alvo foram marcadas com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C por 2 a 3 horas. As células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 com FCS 10% e misturadas com um anticorpo IgG de controle, um anticorpo químérico 7F11 ou um anticorpo humanizado 7F11 (7F11-SFD1/K2 ou 7F11-SFD2/K2) em várias concentrações variando de 5 µg/mL a 0,01 µg/ml. Células NK humanas isoladas de PBMCs, usando kit para isolamento de células NK (Stem Cell Technologies), foram usadas como células efetoras e adicionadas em proporção 1:5 de célula-alvo para efetora. Depois de 2 a 6 horas de incubação, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação MicroBeta Trilux (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida incubando as células-alvo apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue: $[(\text{c.p.m. da amostra} - \text{c.p.m. espontânea}) / (\text{c.p.m. total} - \text{c.p.m. espontânea})] \times 100$. A Figura 35 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo químérico 7F11 e de anticorpos humanizados 7F11, usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que anticorpos humanizados 7F11 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2) median morte por ADCC de modo equivalente ou ligeiramente melhor, quando comparados a um anticorpo químérico 7F11. O isotipo IgG1 de controle revelou somente baixos níveis de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 32: Avaliação das atividades de CDC de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 7F11

Anticorpos humanizados e quiméricos 7F11 foram avaliados

quanto a sua capacidade para mediar citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células expressando CD52. Um ensaio de CDC foi realizado usando os métodos descritos acima no Exemplo 5 para anticorpos quiméricos anti-CD52. Resumidamente, células CHO K1, construídas para expressar proteína CD52 (CHO-CD52), foram usadas como células-alvo e marcadas com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C por 2 a 3 horas. As células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI 1640, misturadas com um anticorpo IgG de controle, um anticorpo químérico 7F11 ou um anticorpo humanizado 7F11 (7F11-SFD1/K2 ou 7F11-SFD2/K2) em várias concentrações variando de 20 µg/mL a 500 ng/ml. Complemento humano (Sigma) foi adicionado às cavidades experimentais para concentração final de 10%. Depois de 1 a 5 horas de incubação, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação MicroBeta Trilux (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida incubando as células-alvo apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue: [(contagens de amostra por minuto (c.p.m.) - c.p.m. espontânea)/(c.p.m. total - c.p.m. espontânea)] X 100. A Figura 36 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo químérico 7F11 e de anticorpos humanizados 7F11 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2), usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que o anticorpo químérico 7F11 e o anticorpo humanizado 7F11-SFD1/K2 mediaram morte equivalente, enquanto o anticorpo humanizado 7F11-SFD2/K2 mediou morte por CDC de modo significativamente melhor do que o anticorpo químérico 7F11. O anticorpo do isótipo IgG1 de controle revelou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 33: Avaliação das atividades de ADCC de anticorpos monoclonais químéricos e humanizados 2C3

Anticorpos humanizados e químéricos 2C3 foram avaliados quanto à sua capacidade para mediar morte por ADCC de células expres-

sando CD52. Um ensaio de ADCC foi realizado usando os métodos descritos acima no Exemplo 6, com ligeiras modificações. Resumidamente, células T isoladas de PBMCs de doadores sadios, usando kit para isolamento de células T CD4+ (Stem Cell Technologies), foram usadas como células-alvo.

5 As células-alvo foram marcadas durante a noite com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C. As células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 com FCS 10%, misturadas com um anticorpo IgG de controle, um anticorpo quimérico 2C3 ou um anticorpo humanizado 2C3 (2C3-SFD1/K12) em várias concentrações variando de 10 µg/mL a 100

10 pg/mL. Células NK humanas isoladas de PBMCs (usando kit para isolamento de células NK da Stem Cell Technologies) foram usadas como células efetoras e foram adicionadas em proporção 1:5 de célula-alvo para efetora. Depois de 2 a 6 horas de incubação, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação

15 MicroBeta Trilux (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida incubando as células-alvo apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue:

20 $[(\text{c.p.m. da amostra} - \text{c.p.m. espontânea}) / (\text{c.p.m. total} - \text{c.p.m. espontânea})] \times 100$. A Figura 37 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo quimérico 2C3 e de anticorpo humanizado 2C3 (2C3-SFD1/K12), usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que o anticorpo humanizado 2C3-SFD1/K12 mediou morte por ADCC equivalente à do anticorpo quimérico 2C3. O isotipo IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

25

Exemplo 34: Avaliação das atividades de CDC de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 2C3

Anticorpos humanizados e quiméricos 2C3 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células expressando CD52. Um ensaio de CDC foi realizado usando os métodos descritos acima no Exemplo 5, com ligeiras modifi-

cações. Resumidamente, células T isoladas de PBMCs de doadores sadios foram usadas como células-alvo e marcadas durante a noite com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) a 37 °C. Depois de serem marcadas durante a noite, as células foram lavadas, ressuspensas em meio RPMI 1640 com FCS 10%, misturadas com um anticorpo IgG de controle, um anticorpo químérico 2C3 ou um anticorpo humanizado 2C3 (2C3-SFD1/K12) em várias concentrações variando de 10 µg/mL a 10 ng/mL. Complemento humano (Sigma) foi adicionado às cavidades experimentais para concentração final de 10%. Depois de 1 a 5 horas de incubação, 25 µL de sobrenadante livre de células foram coletados de cada cavidade e contados em Contador de Cintilação MicroBeta Trilux (Wallac, Gaithersburg, MD). A quantidade de ^{51}Cr liberada espontaneamente foi obtida incubando as células-alvo apenas em meio. A liberação espontânea de células-alvo era tipicamente inferior a 20%. A quantidade total de ^{51}Cr incorporada foi determinada adicionando Triton X-100 1% em água destilada, e o percentual de lise foi calculado como segue: [(contagens por minuto de amostra (c.p.m.) - c.p.m. espontânea) / (c.p.m. total - c.p.m. espontânea)] X 100. A Figura 38 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo químérico 2C3 e de anticorpo humanizado 2C3 (2C3-SFD1/K12), usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que o anticorpo químérico 2C3 e o anticorpo humanizado 2C3 (2C3-SFD1/K12) mediaram lise equivalente. O anticorpo de isotipo IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 35: Avaliação de atividades de ADCC de anticorpos monoclonais químéricos e humanizados 12G6

Anticorpos humanizados e químéricos 12G6 foram avaliados quanto sua capacidade para mediar morte por ADCC de células expressando CD52. Um ensaio de ADCC foi realizado por ensaios de liberação de cromo, usando células T isoladas de PBMCs de doadores sadios como células-alvo, conforme descrito acima no Exemplo 31. A Figura 39 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo químérico 12G6 e de anticorpos humanizados 12G6 (12G6-SFD1/K11 ou 12G6-SFD1/K12), usados no en-

saio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que os anticorpos humanizados 12G6 12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12 mediaram morte equivalente por ADCC, quando comparados ao 12G6 anticorpo químérico. O isotipo IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 36: Avaliação das atividades de CDC de anticorpos monoclonais químéricos e humanizados 12G6

Anticorpos humanizados e químéricos 12G6 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células expressando CD52. Um ensaio de CDC foi realizado por ensaios de liberação de cromo, usando células T isoladas de PBMCs de doadores sadios como células-alvo, conforme descrito acima no Exemplo 32. A Figura 40 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo químérico 12G6 e de anticorpos humanizados 12G6 (12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12), usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que o anticorpo químérico 12G6 mediou lise equivalente, quando comparado a anticorpos humanizados 12G6 (12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12). O anticorpo de isotipo IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 37: Avaliação de atividades de ADCC de anticorpos químéricos e humanizados 9D9

Anticorpos humanizados e químéricos 9D9 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar morte por ADCC de células expressando CD52. Um ensaio de ADCC foi realizado por ensaios de liberação de cromo, usando células T isoladas de PBMCs de doadores sadios como células-alvo, conforme descrito acima no Exemplo 31. A Figura 41 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo químérico 9D9 e de anticorpos humanizados 9D9 (9D9-H10/K13, 9D9-H11/K13, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13), usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que os anticorpos químéricos e humanizados 9D9 (com exceção de 9D9-H10/K13) mediaram morte equivalente por ADCC. O isotipo

IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 38: Avaliação das atividades de CDC de anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados 9D9

5 Anticorpos humanizados e quiméricos 9D9 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células expressando CD52. Um ensaio de CDC foi realizado por ensaios de liberação de cromo, usando células T isoladas de PBMCs de doadores sadios como células-alvo, conforme descrito acima no
 10 Exemplo 32. A Figura 42 ilustra as concentrações de IgG de controle, de anticorpo quimérico 9D9 e de anticorpos humanizados 9D9 (9D9-H10/K13, 9D9-H11/K13, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13), usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que anticorpo quimérico 9D9 mediou lise equivalente, quando comparado a anticorpos
 15 humanizados 9D9 (com exceção de 9D9-H10/K13). O anticorpo de isotipo IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 39: Avaliação de atividades de ADCC de Campath-1H® e de anticorpos humanizados anti-CD52 em células T primárias

20 Campath-1H® e anticorpos humanizados anti-CD52 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar morte por ADCC de células expressando CD52. Um ensaio de ADCC foi realizado por ensaios de liberação de cromo, usando células T isoladas de PBMCs de doadores sadios como células-alvo, conforme descrito acima no Exemplo 31. A Figura 43 ilustra as
 25 concentrações de IgG de controle, de Campath-1H® e de anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13, 9D9-H18/K13, 12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12, usados no ensaio (eixo X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que os anticorpos humanizados 2C3, 9D9 e 12G6 acima mediaram morte por ADCC de modo equivalente ao de Campath-1H®
 30 em concentrações acima de 10 ng/mL. O isotipo IgG1 de controle mostrou somente níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 40: Avaliação das atividades de CDC de Campath-1H® e de anti-

corpos humanizados anti-CD52 em células T primárias

Campath-1H® e anticorpos humanizados anti-CD52 foram avaliados quanto a sua capacidade para mediar citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de células expressando CD52. Um ensaio de CDC foi 5 realizado por ensaios de liberação de cromo, usando células T isoladas de PBMCs de doadores sadios como células-alvo, conforme descrito acima no Exemplo 32. A Figura 44 ilustra as concentrações de IgG de controle, de Campath-1H® e de anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13, 9D9-H18/K13, 12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12, usados no ensaio (eixo 10 X) contra % de lise específica (eixo Y). Os resultados indicam que os anticorpos humanizados 2C3 e 12G6 mediaram morte por CDC de modo equivalente a Campath-1H®, enquanto anticorpos humanizados 9D9 demonstraram atividade de CDC significativamente reduzida, semelhante ao seu antícorpo químérico correspondente. O isotipo IgG1 de controle mostrou somente 15 níveis baixos de morte nas concentrações testadas.

Exemplo 41: Avaliação de capacidade neutralizante de amostras de soro contendo anticorpos neutralizantes anti-Campath-1H® para bloquear a atividade de anticorpos humanizados 2C3, 12G6 e 9D9 anti-CD52

A fim de avaliar a capacidade de anticorpos humanizados ligarem-se a células expressando CD52 na presença de anticorpos neutralizantes contra Campath-1H®, anticorpos anti-CD52 (Campath-1H®, 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12) foram reagidos com soro humano contendo reatividade de antícorpo anti-Campath-1H® e avaliados quando a ligação a células Raji expressando CD52. Amostras de soro obtidas 20 das de pacientes com esclerose múltipla recidivante-remitente que foram incluídos no estudo CAMMS223 (*The CAMMS223 Trial Investigators, "Alemtuzumab vs. interferon Beta-1a in early multiple sclerosis," N Engl J Med* 359:1786-1801 (2008)) foram usadas no ensaio. A administração repetida do 25 anticorpo Campath-1H® resultou na geração de respostas de anticorpo anti-Campath-1H® na maioria dos pacientes. O título de anticorpo anti-Campath-1H é muito baixo no Mês 12 na maioria dos pacientes e aumenta significativamente quando da administração de um segundo ciclo de Campath-1H®, 30

resultando em título alto de resposta anti-Campath-1H® no soro no Mês 13. Ensaios de neutralização de anticorpo anti-CD52 foram conduzidos, usando amostras de soro do Mês 12 e do Mês 13, obtidas de cinco diferentes pacientes com MS (MS-1 a MS-5) que haviam sido tratados com Campath-1H® sob o protocolo de CAMMS223. Os anticorpos anti-CD52, Campath-1H®, 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K12 e 9D9-H16/K13 (usados no Exemplo 30 e demonstrados ligarem-se a células expressando CD52), conjugados com FITC foram usados para corar células Raji que expressam CD52 humana na ausência ou presença de uma gama de diluições de soro obtido de pacientes que haviam sido tratados com Campath-1H. Resumidamente, amostras de soro de pacientes com MS (Mês 12 e Mês 13) foram diluídas em série de 6 vezes e incubadas com 10 µg/mL de anticorpos anti-CD52 conjugados com FITC (Campath-1H®, 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K12 e 9D9-H16/K13) por 1 hora a 37 °C. As células Raji foram lavadas com tampão de coloração, contendo HBSS, FBS 5% e azida 0,1% e, em seguida, depositadas em placas de 96 cavidades de fundo redondo em 1×10^5 células por cavidade. As células foram bloqueadas com 10 µg/mL de fragmento Fc de IgG humana por 30 minutos em gelo e tampão de coloração. As células foram lavadas, em seguida, com tampão de coloração e ressuspensas em 100 µL da mistura de anticorpo-soro, como descrito acima. Depois de 30 minutos no gelo, as células foram lavadas e fixadas com BD Cytofix, e as células revestidas com anticorpo marcado com FITC foram analisadas usando sistema FACSCalibur (Becton Dickinson), após o que, os dados foram analisados usando o software FlowJo versão 7.2 (Tree Star, Inc, Oregon, EUA). A ligação de anticorpos anti-CD52 conjugados com FITC, na presença de anticorpos neutralizantes anti-Campath-1H® no soro, foi avaliada por citometria de fluxo e o % de ligação em relação ao controle, como medida de inibição, foi calculado como $(MFI \text{ com soro}/MFI \text{ de controle (sem soro)}) \times 100$. Dados representativos de um dos doadores (MS-1) são mostrados na Figura 45. O eixo X indica o fator de diluição do soro e o eixo Y, o % de ligação de controle, como medida de atividade neutralizante de anticorpo. Os dados demonstram claramente que amostras de soro de 12 meses não exibem efeito inibidor sobre

Campath-1H® ou outros anticorpos anti-CD52, sugerindo que existe baixo bloqueio ou nenhum de anticorpos anti-Campath-1H® no soro. Amostras de soro do Mês 13 mediaram inibição completa da ligação de Campath-1H®, mesmo em diluição de 1:1000 do soro, mas não mediaram inibição dos anticorpos humanizados 2C3, 12G6 e 9D9 anti-CD52, mesmo na concentração mais alta (diluição de 1:24) testada. Dois dos cinco pacientes desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes anti-Campath-1H® de >1:1000, enquanto que os três outros apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes em torno de 1:100 contra Campath-1H®. Ainda que dois dos soros do Mês 13 dos pacientes apresentassem títulos relativamente altos de anticorpos neutralizantes de >1:1000 contra Campath-1H®, estes soros não inibiram a ligação dos anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K12 e 9D9-H16/K13, sugerindo que a reatividade de anticorpo anti-Campath-1H® em pacientes tratados com Campath-1H® não bloqueou a ligação destes anticorpos humanizados a CD52 presentes em células.

Exemplo 42: Análise de depleção e repovoamento de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52 (4B10-H1/K1)

As atividades de depleção de Campath-1H® e do anticorpo humanoizado anti-CD52 (4B10-H1/K1) em diferentes níveis de dose foram examinadas no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0 mg/kg de cada anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para examinar o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo (N = 5) para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de células T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada análise do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. Um subconjunto de camundongos (N=5) foi mantido vivo para monitorar a cinética de repovoamento. A deple-

ção foi maior no compartimento de células T, com células T CD4+ sendo as mais depletadas, seguidas por células T CD8+, células B, células NK e outras células mieloides. Dentro do compartimento de células T CD4+, células T CD4+ virgens foram as mais depletadas, seguidas por células CD4+ de memória central (CM), CD4+ efetoras de memória (EM) e células T CD4+ reguladoras (Treg). Um padrão semelhante foi observado para células T CD8+ (Virgem>CM>EM). Por outro lado, células B maduras foram depletadas em maior medida do que células B imaturas. A comparação de camundongos tratados com Campath-1H® a camundongos tratados com 4B10-H1/K1 demonstrou padrões semelhantes de células, tanto no sangue como no baço, em cada uma das doses examinadas.

A análise de citocinas séricas demonstrou aumentos dose-dependentes para TNF α , IL-6 e MCP-1. O nível circulante destas citocinas permaneceu elevado, também em comparação a camundongos não tratados nas doses de 0,5 e 0,1 mg/kg. Aumentos discretos foram também observados para IL-10 no grupo tratado com Campath-1H®, nas três doses mais altas, mas somente para a dose mais alta no grupo tratado com 4B10-H1/K1 humanizado. Não foram notados aumentos significativos no nível circulante de IL-12 ou de IFNg (não mostrado).

Em 50 a 60 dias após a administração, com a exceção do grupo de 1,0 mg/kg, os níveis de linfócitos em todos os grupos administrados com Campath-1H® recuaram para os níveis de camundongos não tratados. No grupo de 1,0 mg/kg, os linfócitos retornaram para níveis normais em 80 dias após a administração. Cinética semelhante de repovoamento foi também observada para os camundongos tratados com o anticorpo humanizado 4B10-H1/K1. Os linfócitos recuaram para níveis de controle em 50 dias após a administração em todos os grupos tratados com 4B10-H1/K1, com a exceção do nível de 0,5 mg/kg. Os níveis de linfócitos circulantes no grupo de 0,5 mg/kg permaneceu diminuído durante todo o ciclo do período de monitoração. Linfócitos totais foram monitorados quanto ao repovoamento no sangue.

As Figuras 46A-46E mostram o nível de células T CD4+, células

T CD8+ e células B B220+ no sangue após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10"). As Figuras 47A-47E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no baço após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10"). As Figuras 48A-48E mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10"). As Figuras 49A-49B mostram o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após administração com Campath-1H® ("Campath") e anticorpos humanizados 4B10-H1/K1 ("4B10").

Exemplo 43: Análise de depleção e repovoamento de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2)

A atividade de depleção de anticorpos humanizados (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2) em diferentes níveis de dose foi examinada em camundongos transgênicos huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg/kg de cada anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para examinar o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo (N = 5) para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de células T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. Um subconjunto de camundongos (N = 5) foi mantido vivo para monitorar a cinética de repovoamento. A administração de cada anticorpo humanizado 7F11 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2) em todas as doses resultou em depleção de um número significativo de células T e de células B no sangue. Esses dados demonstraram também que vários subconjuntos de células T e B são depletados em graus variados, dependendo da dose usada de anticorpo. Células T virgens (tanto CD4 como CD8) de-

monstraram a maior depleção, com outras populações celulares (incluindo células de memória e T reg) sendo depletadas em grau inferior. No compartimento de células B, células B maduras foram depletadas mais rapidamente do que células B imaturas. No baço, depleção dose-dependente foi observada, com depleção significativa de linfócitos observada nos níveis de dose de 5 e 1 mg/kg. Semelhantemente à situação no sangue, células T virgens foram mais rapidamente depletadas do que células de memória. Células B foram depletadas em menor medida do que células T, com cada um dos clones 7F11 humanizados (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2). Depleção não foi observada para células NK ou neutrófilos no sangue ou no baço em quaisquer das doses injetadas. A análise de citocinas séricas demonstrou aumentos dose-dependentes para TNF α e IL-6. Os níveis destas citocinas permaneceram elevados, quando também comparados a camundongos não tratados nas doses de 0,5 e 0,1 mg/kg. Aumentos dose-dependentes no nível de MCP-1 circulante foram também notados.

Em 30 dias após a administração, os níveis de linfócitos nos grupos administrados com 0,1 e 0,1 mg/kg recuaram para os níveis de camundongos não tratados. Nos grupos de 1,0 e 5,0 mg/kg, os linfócitos retornaram para níveis normais em 50 e 80 dias, respectivamente, para o clone 7F11-SFD1/K2, e em 80 dias após a administração para os grupos de 1,0 e de 5,0 mg/kg do clone 7F11-SFD2/K2. Linfócitos totais foram monitorados quanto ao repovoamento no sangue.

As Figuras 50A-50E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no sangue após 72 horas da administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2"). As Figuras 51A-51E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no baço após 72 horas da administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2"). As Figuras 52A-52F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2"). As Figuras 53A-53B mostram o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de

tempo após administração com os anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 ("7F11 SFD1") e 7F11-SFD2/K2 ("7F11 SFD2").

Exemplo 44: Análise de anticorpos humanizados 7F11 anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2)

5 A atividade de depleção dos anticorpos quiméricos 7F11 e anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2, em comparação a Campath-1H®, foi examinada no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 1,0 mg/kg de cada anticorpo. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, 10 e sangue e baços foram coletados de cada camundongo (N = 5) para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de células T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante 15 ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. A administração de Campath-1H® resultou em depleção de um número significativo de células T e de células B no sangue e no baço. Embora um nível comparável de depleção de células T fosse observado no sangue para o anticorpo químérico e os humanizados 7F11 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2), as células B foram 20 depletadas em menor medida. Essa observação foi também evidente no baço, onde depleção significativa de células T foi notada, mas somente nível modesto de depleção de células B foi alcançado com os anticorpos 7F11 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2).

As Figuras 54A-54B mostram o nível de células T CD4+, células 25 T CD8+ e células B B220+ no sangue após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath"), anticorpos quiméricos 7F11 e de anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2.

Exemplo 45: Análise de Perfis PK de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 (7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2)

30 Visando assegurar que o processo de humanização não alterasse a taxa de depuração do anticorpo, o perfil farmacocinético do anticorpo químérico 7F11 anti-CD52 e dos anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 e

7F11-SFD2/K2 anti-CD52 foi determinado em camundongos transgênicos huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com anticorpos a 5 mg/kg, e sangue foi coletado em vários momentos, iniciando duas horas após a administração. O nível circulante de cada anticorpo foi avaliado, usando ELISA para anti-IgG humana. Para cada um dos clones humanizados, houve uma ligeira diferença na Cmax, notada em 2 horas após a administração. As taxas de depuração para o anticorpo quimérico 7F11 e anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2 foram semelhantes, bem como em relação ao Campath-1H® no decorrer do experimento, indicando que o processo de humanização não alterou significativamente o perfil farmacocinético dos anticorpos.

A Figura 55 mostra o nível de Campath-1H® ("Campath"), de anticorpo quimérico 7F11 e de anticorpos humanizados 7F11-SFD1/K2 e 7F11-SFD2/K2 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

,15 Exemplo 46: Análise de depleção e repovoamento de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52 (2C3-SFD1/K12)

A atividade de depleção do clone 2C3-SFD1/K12 em diferentes níveis de dose foi examinada no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0 mg/kg de anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para examinar potencialmente o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo (N = 5) para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos subpopulações de células T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção.

30 Um subconjunto de camundongos (N = 5) foi mantido vivo para monitorar a cinética de repovoamento. A administração de 2C3-SFD1/K12 nas doses de 5, 1 e 0,5 mg/kg resultou em depleção de um número significativo de células

T e de células B no sangue. Um nível variável de depleção de linfócitos foi observado no sangue na dose de 0,1 mg/kg, com células T CD4+ e células B sendo depletadas em maior medida do que células T CD8+. Esses dados demonstraram também que vários subconjuntos de células T e B são depletados em graus variados, dependendo da dose usada de anticorpo. Células T virgens (tanto CD4 como CD8) demonstraram a maior depleção, quando comparadas a outras populações celulares (incluindo células de memória e T reg), as quais foram depletadas em grau inferior. No compartimento de células B, células B maduras foram depletadas mais rapidamente do que células B imaturas. No baço, depleção dose-dependente foi observada com depleção significativa de linfócitos observada nos níveis de dose de 5 e 1 mg/kg. Semelhantemente ao Campath-1H®, células T virgens foram mais rapidamente depletadas do que células de memória. Depleção foi observada para células NK e neutrófilos no sangue, mas pouca ou nenhuma depleção foi observada no baço em quaisquer das doses injetadas. A análise de cito-25 cinas séricas demonstrou aumentos dose-dependentes para TNF α e para IL-6, com a dose de 5 mg/kg induzindo o nível mais alto de cada citocina. Níveis comparável aos de camundongos não tratados foram observados nos níveis de dose de 0,5 e 0,1 mg/kg, para TNF α , e no nível de dose de 0,1 mg/kg para IL-6. Aumentos dose-dependentes no nível de MCP-1 circulante 30 foram também notados.

Em 30 dias após a administração, os níveis de linfócitos para os grupos de 0,1 e 0,5 mg/kg recuaram para os níveis de camundongos não tratados. Nos grupos de 1,0 e 5,0 mg/kg, os linfócitos retornaram a níveis normais em 80 dias após a administração. Linfócitos totais foram monitorados quanto ao repovoamento no sangue.

As Figuras 56A-56E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220 no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12. As Figuras 57A-57E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no baço após 72 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12. As Figuras 58A-58F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de anticorpos

2C3-SFD1/K12. A Figura 59 mostra o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após administração com anticorpos 2C3-SFD1/K12.

Exemplo 47: Análise de depleção e repovoamento de anticorpos anti-CD52

5 em camundongos transgênicos huCD52 (12G6-SFD1/K11)

A atividade de depleção do clone 12G6-SFD1/K11 em diferentes níveis de dose foi examinada no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0 mg/kg de anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para 10 potencialmente examinar o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo (N = 5) para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de célula T *helper* 15 (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. Um subconjunto de camundongos (N = 5) foi mantido vivo para monitorar a 20 cinética de repovoamento. A administração de 12G6-SFD1/K11 nas doses de 5, 1 e 0,5 mg/kg resultou em depleção de um número significativo de células T e de células B no sangue. Um nível variável de depleção de linfócitos foi observado no sangue na dose de 0,1 mg/kg, com células T CD4+ e células B sendo depletadas em maior medida do que células T CD8+. Esses dados demonstraram também que vários subconjuntos de células T e B são 25 depletados em graus variados, dependendo da dose usada de anticorpo. Células T virgens (tanto CD4 como CD8) demonstraram a maior depleção, quando comparadas a outras populações celulares (incluindo células de memória e T reg), as quais foram depletadas em grau inferior. No compartimento de células B, células B maduras foram depletadas mais rapidamente 30 do que células B imaturas. No baço, depleção dose-dependente foi observada com depleção significativa de linfócitos observada nos níveis de dose de

5 e 1 mg/kg. Semelhantemente ao Campath-1H®, células T virgens foram mais rapidamente depletadas do que células de memória. Depleção foi observada para células NK e neutrófilos no sangue, mas pouco a nenhuma depleção foi observada no baço em quaisquer das doses injetadas. A análise de citocinas séricas demonstrou aumentos dose-dependentes para TNF α e IL-6, com a dose de 5 mg/kg induzindo o nível mais alto de cada citocina. Níveis comparáveis aos de camundongos não tratados foram observados nos níveis de dose de 0,5 e 0,1 mg/kg, para TNF α , e no nível de dose de 0,1 mg/kg para IL-6. Aumentos dose-dependentes no nível de MCP-1 circulante foram também notados.

10 Em 30 dias após a administração, os níveis de linfócitos recuaram para os níveis de camundongos não tratados. Nos grupos de 1,0 e 5,0 mg/kg, os linfócitos retornaram para níveis normais em 80 dias após a administração. Linfócitos totais foram monitorados quanto ao repovoamento no sangue.

15 As Figuras 60A-60E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11. As Figuras 61A-61E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no baço após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11. As Figuras 62A-62F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11 ("12G6 hu"). A Figura 63 mostra o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após administração com anticorpos 12G6-SFD1/K11.

20 25 Exemplo 48: Análise de perfil PK de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos para CD52 (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11 e 9D9-H10/K12)

Os perfis farmacocinéticos de anticorpos anti-CD52 foram determinados em camundongos transgênicos huCD52. Este experimento comparou a forma quimérica e a humanizada dos anticorpos para assegurar que o processo de humanização não alterava a taxa de depuração dos anticorpos. As comparações incluíram os anticorpos químéricos 2C3, 12G6 e 9D9 e os anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11 e 9D9-

H10/K12. Os camundongos foram injetados por via iv com anticorpos em dose de 5 mg/kg, e sangue foi coletado em vários momentos, iniciando duas horas após a administração. Os níveis circulantes de cada anticorpo foram avaliados, usando ELISA para anti-IgG humana. Para cada par do anticorpo quimérico/humanizado, houve uma ligeira diferença na Cmax notada em 2 horas após a administração. Para os anticorpos 2C3 e 12G6, a Cmax da versão humanizada (ou seja, 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K11) foi ligeiramente mais alta, enquanto a versão químérica foi ligeiramente mais alta para o par de 9D9. As taxas de depuração para os pares de anticorpos foram semelhantes sobre o período do experimento, indicando que o processo de humanização não alterou significativamente o perfil farmacocinético dos anticorpos.

As Figuras 64A-64C mostram o nível de anticorpos químéricos 2C3, 2C3-SFD1/K12, químérico 12G6, 12G6-SFD1/K11, químérico 9D9 e 15 9D9-H10/K12 no sangue sobre um período de tempo após a administração.
Exemplo 49: Análise de depleção e repovoamento de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52 (9D9-H10/K12)

A atividade de depleção do clone 9D9-H10/K12 em diferentes níveis de dose foi examinada no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0 mg/kg de anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para potencialmente examinar o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo (N = 5) para determinar o nível de depleção 20 celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de célula T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise do 25 subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. Um subconjunto de camundongos (N = 5) foi mantido vivo para monitorar a cinética de repovoamento. A administração de 9D9-H10/K12 nas doses de 5,

1 e 0,5 mg/kg resultou em depleção de um número significativo de células T e células B no sangue. Somente um nível modesto de depleção de linfócitos foi observado no sangue na dose de 0,1 mg/kg. Esses dados demonstraram também que vários subconjuntos de células T e B são depletados em graus variados, dependendo da dose usada de anticorpo. Células T virgens (tanto CD4 como CD8) demonstraram a maior depleção, quando comparadas a outras populações celulares (incluindo células de memória e T reg), as quais foram depletadas em grau inferior. No compartimento de células B, células B maduras foram depletadas mais rapidamente do que células B imaturas. No baço, depleção significativa destas células foi observada somente nos níveis de dose de 5 e 1 mg/kg. Semelhantemente ao Campath-1H®, células T virgens foram mais rapidamente depletadas do que células de memória. Depleção foi observada para células NK e neutrófilos no sangue, mas pouca ou nenhuma depleção foi observada no baço em quaisquer das doses injetadas. A análise de citocinas séricas não demonstrou aumentos significativos para TNF α ou IL-6 em quaisquer dos níveis de dose testados. Aumentos dose-dependentes no nível de MCP-1 circulante, foram, contudo, notados.

A parte de repovoamento deste experimento foi encerrada precocemente, quando linfócitos foram repovoados em 50 - 80% (dependendo da dose). O repovoamento de linfócitos foi monitorado com base em contagens de linfócitos totais e não de células T e B.

As Figuras 65A-65E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9"). As Figuras 66A-66E mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+ no baço após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9"). As Figuras -67F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9"). A Figura 68 mostra o repovoamento de linfócitos circulantes sobre um período de tempo após administração com anticorpos 9D9-H10/K12 ("9D9").

Exemplo 50: Análise de depleção e repovoamento de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52 (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11

and 9D9-H10/K12)

A atividade de depleção de Campath-1H® e dos clones humanizados 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11 e 9D9-H10/K12 em diferentes níveis de dose foi examinada no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1 ou 1,0 mg/kg de anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para potencialmente examinar o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de células T helper (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. Todos os anticorpos humanizados (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11 e 9D9-H10/K12) mediaram depleção de linfócitos no baço e sangue, quando comparados com animais tratados com PBS. A depleção foi mais robusta no sangue do que no baço para todos os anticorpos, e ocorreu de modo dose-dependente em ambos os tecidos. A depleção foi mais drástica para células T CD4 e CD8+, com menos depleção no compartimento de células B. Vários subconjuntos de células T e B foram depletadas em graus variados. Células T virgens (tanto CD4 como CD8) demonstraram a maior depleção, quando comparadas a outras populações celulares (incluindo células de memória e T reg), as quais foram depletadas em grau inferior. No compartimento de células B, células B maduras foram depletadas mais rapidamente do que células B imaturas. A análise de citocinas séricas revelou aumentos significativos no nível de IL-6, MCP-1 e TNF α , após 2 horas da administração. Aumentos foram notados para todos os anticorpos, incluindo Campath-1H®, e dose-dependentes (ou seja, níveis mais altos de citocinas foram observados para o nível de dose de 1,0 mg/kg do que para a dose de 0,1 mg/kg). Em comparação ao Campath-1H®, 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K11 induziram níveis semelhantes de

IL-6, enquanto 9D9-H10/K12 induziu IL-6 em grau significativamente menor. Para MCP-1, o anticorpo 12G6-SFD1/K11 induziu níveis mais baixo, e tanto 12G6-SFD1/K11 como 9D9-H10/K12 diminuíram os níveis de TNF α , quando comparados a Campath-1H®.

5 As Figuras 69A-69D mostram o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B) e de subtipos de células T CD4+, células T CD8+ e células B220+ B/NK no sangue após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 12G6-SFD1/K11 ("12G6") e 9D9-H10/K12 ("9D9"). As
10 Figuras 70A-70D mostram o nível de populações de linfócito em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B) e de subtipos de células T CD4+, células T CD8+ e células B220+ B/NK no baço após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 12G6-SFD1/K11 ("12G6") e 9D9-H10/K12 ("9D9"). As Figuras 71A-71F mos-
15 tram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de Campath-1H® e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11 e 9D9-H10/K12.

Exemplo 51: Comparação direta de clones humanizados 9D9 anti-huCD52 em camundongos transgênicos huCD52 (9D9 H10/K12 e 9D9 H11/K12)

20 A atividade de depleção de dois clones humanizados 9D9 anti-CD52 (9D9-H10/K12 e 9D9-H11/K12) foi examinada em camundongos transgênicos huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1 ou 1,0 mg/kg de anticorpo. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada
25 camundongo para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de células T helper (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células NK totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. O
30 tratamento com qualquer um dos anticorpos resultou em depleção semelhante de linfócitos no sangue e baço, com a depleção de linfócitos no sangue sendo mais robusta. Adicionalmente, células T CD4 e células T CD8+

foram mais fortemente depletadas do que células B e células NK nos dois tecidos. Embora a depleção com o clone 9D9-H10/K12 pareça mais robusta do que a depleção com o clone 9D9-H11/K12, a diferença não é estatisticamente significativa.

- 5 A Figura 72 mostra o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 e 9D9-H11/K12. A Figura 73 mostra o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK no baço após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H10/K12 e 9D9-H11/K12.
- 10 Exemplo 52: Comparação direta de clones humanizados 12G6 anti-huCD52 em camundongos transgênicos huCD52 (12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1-K12)

A atividade de depleção de dois clones 12G6 humanizados anti-CD52 (12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12) foi examinada no camundongo transgênico huCD52. Os camundongos foram injetados por via intravenosa com 0,1 ou 1,0 mg/kg de anticorpo. Duas horas após a administração, soro foi coletado para potencialmente examinar o nível de citocinas circulantes. Três dias após a administração, os camundongos foram sacrificados, e sangue e baços foram coletados de cada camundongo para determinar o nível de depleção celular, usando análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos de subpopulações de células T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongos transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. A administração do anticorpo 12G6-SFD1/K11 ou do anticorpo 12G6-SFD1/K12 resultou em nível significativo de depleção de linfócitos no sangue. Aparentemente, houve pouca a nenhuma diferença na atividade de depleção de linfócitos dos dois clones. O padrão de depleção de linfócitos foi tal que células T CD4 virgens e células T CD8+ foram depletadas em grau mais alto do que células T de memória ou células Treg. As populações de células mieloides foram depletadas em menor grau, independentemente do

clone (12G6-SFD1/K11 ou 12G6-SFD1/K12) ou da dose. A análise de citocinas séricas não foi realizada para este experimento.

As Figuras 74A-74D mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+/NK e células mieloides no sangue após 72 horas 5 da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11 ("12G6 K11") e 12G6-SFD1/K12 ("12G6 K12"). As Figuras 75A-75D mostram o nível de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+/NK e células mieloides no baço após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-SFD1/K11 ("12G6 K11") e 12G6-SFD1/K12 ("12G6 K12").

10 Exemplo 53: Comparação direta de clones humanizados 9D9 de anti-huCD52 em camundongos transgênicos huCD52 (9D9 H11/K12, 9D9 H16/K13 e 9D9 H18/K13)

A atividade de depleção de três anticorpos humanizados 9D9 (9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13, and 9D9-H18/K13) foi comparada no camundongo transgênico huCD52. Camundongos transgênicos para CD52 humana foram tratados com PBS, como controle por veículo, e com 1 mg/kg ou 15 0,1mg/kg de cada anticorpo. Em duas horas após a administração, soro foi coletado para determinar o nível de citocinas circulantes. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados, e sangue periférico e o baço foram 20 coletados e processados para análise por citometria de fluxo. Amostras foram avaliadas para determinar os números relativos subpopulações de célula T *helper* (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), células B (B220+) e células mieloides totais, presentes no sangue periférico circulante ou no baço de camundongo transgênicos huCD52. Adicionalmente, foi realizada uma análise 25 do subconjunto de células T e B para determinar o efeito global de depleção. Todos os anticorpos 9D9 (9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13) mediaram depleção celular de populações de linfócitos e de células mieloides no sangue e baço em medida semelhante. A depleção observada de linfócitos e de células mieloides foi mais robusta no sangue do que no baço. 30 A comparação da atividade de depleção dos clones 9D9 (9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13) demonstrou que 9D9-H16/K13 resultou na depleção mais robusta, seguido por 9D9-H18/K13 e 9D9-H11/K12. Isso foi

mais evidente para linfócitos no baço, na dose de 1 mg/kg na qual o tratamento com 9D9-H16/K13 resultou em grau mais alto de depleção do que com qualquer um dos outros clones (9D9-H18/K13 e 9D9-H11/K12). Além disso, o padrão de depleção foi tal que células T CD4 virgem e CD8+ foram
 5 depletadas em grau mais alto do que células T de memória ou células Treg, e populações de células B foram depletadas em grau mais alto com 9D9-H16/K13. Populações de células mieloides foram menos afetadas pelo tratamento anti-CD52, independentemente do clone de anticorpo (9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 ou 9D9-H18/K13) da dose. Das citocinas analisadas,
 10 aumentos foram notados em IL-6, TNF α e MCP-1. Após a injeção, níveis circulantes semelhantes de IL-6 e MCP-1 foram observados para todos os clones 9D9 (9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13), no nível de dose de 0,1 e no de 1,0 mg/kg. Ligeiras diferenças foram observadas com níveis circulantes de TNF α , em que a injeção do clone 9D9-H16/K13 resultou em
 15 aumento modesto na dose de 1,0 mg/kg.

A Figura 76 mostra o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13. As Figuras 77A-77D mostram o nível de subtipos de células T
 20 CD4+, células T CD8+, células B, B220+/NK e células mieloides no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13. A Figura 78 mostra o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) no baço após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e
 25 9D9-H18/K13. As Figuras 79A-79D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B, B220+/NK e células mieloides no baço após 72 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13. As Figuras 80A-80F mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de anticorpos 9D9-H11/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.
 30

Exemplo 54: Análise de perfil PK de anticorpos anti-CD52 das famílias 2C3, 12G6 e 9D9 em camundongos transgênicos para CD52

Os perfis farmacocinéticos de 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 humanizados foram determinados em camundongos transgênicos huCD52. Os camundongos foram injetados por iv com anticorpos em dose de 1mg/kg, e sangue foi coletado em vários momentos, iniciado duas horas após a administração. Os níveis circulantes de cada anticorpo foram avaliados usando ELISA para anti-Ig humana. A meia-vida calculada foi: 2C3-SFD1/K12 $79,0 \pm 23,9$ horas, 12G6-SFD1/K11 $49,0 \pm 14,4$ horas, 12G6-SFD1/K12 $75,1 \pm 28,5$, 9D9-H16/K13 $59,8 + 26,6$ horas and 9D9-H18/K13 $42,2 + 15,7$ horas.

No geral, houve uma variabilidade interanimal significativa para exposição nestes estudos. A meia-vida terminal de eliminação de 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K12 foi semelhante, enquanto a meia-vida de 12G6-SFD1/K11 foi mais curta, mas não significativamente diferente. A depuração (*clearance*) foi mais rápido 2C3-SFD1/K12, seguido por 12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12. Os dois tratamentos com 12G6 refletiram um ao outro na maioria dos momentos medidos, enquanto 2C3-SFD1/K12 mostrou menos exposição e depuração mais rápida. 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 foram bem semelhantes para todos os parâmetros PK medidos.

As Figuras 81A-81B mostram o nível de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

Tabela 16

Parâmetros PK	2C3-SFD1/K12	12G6-SFD1/K11	12G6-SFD1/K12	9D9-H16/K13	9D9-H18/K13
t _{1/2} (h)	$79,0 \pm 23,9$	$49,0 \pm 14,4$	$75,1 \pm 28,5$	$59,8 \pm 26,6$	$42,2 \pm 15,7$
Cl (ml/h/kg)	$20,3 \pm 2,9$	$10,6 \pm 1,69$	$7,08 \pm 1,80$	$5,64 \pm 1,73$	$6,65 \pm 3,02$
Vz (ml/kg)	2251 ± 539	770 ± 294	721 ± 224	445 ± 133	366 ± 100
AUC (ug*h/ml)	$251 \pm 37,2$	485 ± 104	747 ± 188	$196 \pm 70,2$	$174 \pm 65,2$
C _{max} (ug/ml)	$4,22 \pm 0,54$	$7,12 \pm 1,97$	$8,96 \pm 2,33$	$3,58 \pm 2,16$	$4,35 \pm 1,54$

Exemplo 55: Avaliação de tempestade (*storm*) de citocinas em resposta a tratamento com anticorpos anti-CD52

A liberação de citocinas séricas após tratamento com anticorpos anti-CD52 foi avaliada em camundongos transgênicos huCD52. Os animais foram tratados com 1 mg/kg de Campath-1H®, 12G6-SFD1/K11, 12G6-

SFD1/K12, 9D9-H16/K13 ou 9D9-H18/K13. Um grupo de animais foi tratado com 5 mg/kg de 2C3-SFD1/K12 em vista de resultados prévios indicando que a injeção com 2C3-SFD1/K12 pode resultar em níveis mais baixos de depleção, quando comparado a os outros anticorpos, normalizando com isso 5 os grupos com base na dose necessária para alcançar níveis semelhantes de depleção. Todos os grupos foram sangrados depois de 1 2, 4, 24 e 48 horas do tratamento, e análise por CBA para citocinas inflamatórias foi conduzida. Todos os grupos foram também sacrificados 3 dias após o tratamento, e os baços foram avaliados quanto à depleção de linfócitos por citometria 10 de fluxo. O tratamento com cada um dos anticorpos resultou em depleção de vários alvos, semelhante àquela observada para Campath-1H®. Isso foi também verdadeiro para 2C3-SFD1/K12, em que uma dose 5 mg/kg foi utilizada para provocar depleção semelhante. Alguma variabilidade em depleção 15 foi observada com 12G6-SFD1/K12 e 9D9-H16/K13, mas possivelmente causada pelo sangramento repetido dos animais para obter soro para análise de citocinas. A expressão de citocinas, no entanto, foi menor para anticorpos dos membros das famílias 12G6 (12G6-SFD1/K11 e 12G6-SFD1/K12) e 9D9 (9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13). Esse achado foi mais acentuado para liberação de IL-6, MCP-1 e TNF α nos momentos iniciais de 1 20 e 2 horas.

As Figuras 82A-82F mostram o nível de citocinas no sangue sobre um período de 48 horas, após a administração de Campath-1H® ("Campath") ou anticorpos 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 ou 9D9-H18/K13. As Figuras 83A-83E mostram o nível de linfócitos em massa, 25 células T CD4+, células T CD8+, células B B220+/NK e células mieloides no baço após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") ou anticorpos 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 ou 9D9-H18/K13.

Exemplo 56: Avaliação da cinética de repovoamento no sangue de camundongo transgênico para CD52 após tratamento com anticorpos anti-CD52

A cinética de repovoamento de vários tipos de células foi avaliada 30 após administração de dos anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12 anti-CD52. Os camundongos foram injetados

por via iv com cada anticorpo, em dose de 2 mg/kg, para assegurar nível robusto de depleção. Em vários momentos após a injeção, o sangue foi coletado para análise por citometria de fluxo, visando determinar o nível de linfócitos circulantes no sangue, incluindo células CD4+ e células T CD8+, células T reguladoras, células B, células NK, neutrófilos e macrófagos. Não foram observadas diferenças na atividade inicial de depleção para cada anticorpo, o que foi confirmado no Dia 3 após a injeção. Os camundongos foram sangrados semanalmente durante o primeiro mês e a cada duas semanas, posteriormente, para monitorar a cinética de repovoamento. A cinética do repovoamento de linfócitos foi semelhante para qualquer dos anticorpos anti-CD52 (2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12), quando comparados a Campath-1H®. No Dia 57, as células B retornaram ao basal no sangue, enquanto as células T se aproximaram de níveis basais no Dia 84. No Dia 116, as células T CD8+ não retornaram a níveis de controle, mas cinética semelhante de repovoamento para todos os outros tipos de células monitorados foi observada com cada um dos anticorpos anti-CD52 (2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12) e Campath-1H®.

As Figuras 84A-84G mostram o repovoamento de células T CD4+ e CD8+ circulantes, células T reguladoras, células B, células NK, neutrófilos e macrófagos sobre um período de tempo após a administração de Campath-1H® ("Campath") e dos anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12.

Exemplo 57: Avaliação de expressão de CD52 em camundongos transgênicos para CD52 usando os anticorpos anti-CD52

A expressão de huCD52 foi avaliada usando os anticorpos humanizados para determinar se padrões semelhantes de coloração poderiam ser observados sobre populações celulares maduras e em desenvolvimento em camundongos transgênicos huCD52. Os anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 foram conjugados com FITC para uso em coloração para citometria de fluxo. Tecidos de camundongos transgênicos huCD52 foram coletados e processados para coloração. Os anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12,

9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 coraram linfócitos expressando huCD52 do baço de camundongos transgênicos, de modo semelhante ao Campath-1H®. Os padrões de coloração foram representativos das populações de linfócitos e subconjuntos encontrados em outros órgãos linfoideos, como o timo e a medula óssea.

A Figura 85 mostra a capacidade de Campath-1H® e dos anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13 marcados com FITC se ligarem especificamente a huCD52 em populações celulares de linfócitos no baço.

10 Exemplo 58: Comparação direta de tratamento de dose única com anti-huCD52 em camundongos transgênicos huCD52

A atividade de depleção de vários anticorpos humanizados anti-CD52 (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13) foi comparada no camundongo transgênico. Os camundongos foram injetados por via iv com anticorpos na dose de 1 mg/kg. Em 2 horas após a administração, soro foi coletado para análise de citocinas. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados, e sangue e o baço foram coletados para comparar o nível de depleção de linfócitos. Níveis significativos de depleção de células B e T foram observados para todos os anticorpos anti-CD52 (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13) e foram comparáveis àqueles observados após administração de Campath-1H®. A análise de subconjuntos não revelou também diferenças significativas no nível de depleção para cada anticorpo (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13), no sangue ou no baço. Após injeção de Campath-1H®, houve aumento acentuado nos níveis circulantes de IL-6 e TNF α . Embora a injeção de cada um dos anticorpos anti-CD52 (2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13) resultassem em diminuição significativa no nível de TNF α , quando comparados a Campath-1H®, os níveis de IL-6 foram semelhantes.

As Figuras 86A-86E mostram o nível de populações de linfócito em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) e de subti-

pos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+/NK e células mieloides no sangue após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13. As Figuras 87A-87E mostram o nível de populações de linfócito em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) e de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+/NK e células mieloides no baço após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13. As Figuras 88A-88C mostram os níveis de citocinas circulantes após 2 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e anticorpos 2C3-SFD1/K12, 12G6-SFD1/K11, 12G6-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 9D9-H18/K13.

Exemplo 59: Depleção profunda de linfócitos em camundongos transgênicos para huCD52 após tratamento com dose única com anticorpos anti-huCD52

A análise extensa de depleção foi realizada no camundongo transgênico huCD52, usando anticorpos anti-CD52 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12. Camundongos (N = 4) foram injetados por iv com uma dose única de cada anticorpo a 1 mg/kg. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados, e sangue, baço, linfonodos e timo foram coletados para comparar o nível de depleção de linfócitos, usando análise multicolorida por citometria de fluxo. Níveis significativos de depleção de células B e T foram observados para todos os anticorpos anti-CD52, 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12, e foram comparáveis àqueles observados após administração de Campath1H® em cada tecido examinado. A análise de subconjuntos não revelou também diferenças significativas no sangue ou no baço. Níveis significativos de depleção de linfócitos foram também observados nos linfonodos de camundongos. Pareceu, no entanto, haver alguma variabilidade na atividade do anticorpo, especialmente quando investigado o subconjunto de células T de memória frontal e efetoras. Devido a questões técnicas referentes ao LSR-II e o corante CD8, o timo não pôde ser avaliado.

As Figuras 89A-89D mostram o nível de subtipos de células T

CD4+, células T CD8+, células B B220+, e células NK/ mieloides no sangue após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12. As Figuras 90A-90D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B 5 B220+, e células NK/ mieloides no baço após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 and 12G6-SFD1/K12. As Figuras 91A-91D mostram o nível de subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+, e células NK/ mieloides no linfonodo após 72 horas da administração de Campath-1H® ("Campath") 10 e de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12.

Exemplo 60: Criação e avaliação do camundongo transgênico huCD52 Knock-in/Knock-out (KI/KO) em antecedentes de C57BL/6

Um novo modelo de camundongo com *knock-in* (expressão diminuída)/*knock-out* (expressão desabilitada) de CD52 foi criado sobre os 15 antecedentes de C57Bl/6. Para criar este camundongo, a sequência do gene de CD52 do camundongo foi substituída pela sequência do gene da CD52 humana. A estratégia direcionada permitiu a substituição da sequência do camundongo pela sequência humana, enquanto era mantida a estrutura e-xon-intron. Um marcador de seleção foi usado para identificar progênie contendo a nova sequência de gene. O alelo final foi criado pela retirada do 20 marcador de seleção, deixando somente a sequência do gene da CD52 humana.

A caracterização básica do modelo de camundongo huCD52 KI/KO envolveu determinar o nível de expressão de CD52 humana em linfócitos. Sangue de camundongos transgênicos huCD52-KI/KO (N = 4) e de 25 camundongos C57BL/6 (N = 2) foram corados para expressão de hCD52, e o número de moléculas de CD52/célula foi enumerado usando o ensaio de anticorpo anti-humano Simply Cellular do laboratório Bang. A coloração de células do sangue periférico de camundongos transgênicos huCD52-KI/KO 30 demonstrou que a expressão de huCD52 é muito alta na maioria dos linfócitos destes animais. Os níveis de expressão foram semelhantes àqueles observados em populações de células CD4, CD8 e B humanas. Os níveis de

expressão em células NK e macrófagos foram mais baixos do que os observados para células T e células B. Nível aumentado de expressão de huCD52 foi detectado em neutrófilos nestes camundongos, ao contrário do nível diminuído de expressão em neutrófilos humanos ou de células semelhantes da linhagem original do camundongo transgênico sobre os antecedentes de CD-1. Níveis semelhantes de expressão de CD52 foram observados em células T e células B do camundongo transgênico huCD52 CD1 original e o camundongo huCD52 KI/KI.

A Figura 92A mostra o nível de expressão de huCD52 em subtipos de células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK/células mieloides em camundongos transgênicos huCD52-KI/KO e não transgênicos de controle. A Figura 92B mostra o nível de expressão de huCD52 em células T CD4+, células T CD8+ e células B em camundongos transgênicos huCD52-KI/KO e huCD52 CD1.

Exemplo 61: Comparação direta de características de depleção entre lotes em pequena e grande escala de 12G6 e 2C3

Camundongos transgênicos huCD52 KI/KO foram administrados com 12G6-SFD1/K12 ou 2C3-SFD1/K12 para determinar a atividade de depleção. Adicionalmente, a atividade foi examinada usando anticorpos gerados de duas diferentes fontes (lotes em pequena escala e em grande escala) na Genzyme. Os camundongos foram injetados por iv com cada anticorpo em dose de 1 mg/kg. Três dias após a injeção, os camundongos foram sacrificados, e o sangue foi coletado para análise por citometria de fluxo para determinar os níveis circulantes de células T CD4+ e células T CD8+, células B, células NK, neutrófilos e macrófagos. Não foram observadas diferenças significativas em depleção de células T CD4, células T CD8+, células B e células NK entre os anticorpos derivados de lote em pequena escala e em grande escala.

Os vários lotes de anticorpos 12G6-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12 foram avaliados também por citometria de fluxo para comparar a intensidade de coloração em esplenócitos de camundongos transgênicos huCD52-KI/KO. Os dois anticorpos, 12G6-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12, parecem re-

conhecer CD52 humana na mesma medida que Campath-1H® em esplenóцитos isolados. Adicionalmente, não houve diferença no nível de reconhecimento entre as duas fontes (lotes em pequena escala e em grande escala) de anticorpo.

5 As Figuras 93A-93B mostram a ligação a huCD52 de anticorpos 12G6-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12 (de várias fontes de produção), quando comparados a Campath-1H® de controle. A Figura 94 mostra o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+ e células B B220+) no sangue após 72 horas da administração de anticorpos 12G6-
10 SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12 de várias fontes de produção.

Exemplo 62: Análise de perfil PK de anticorpos anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52-KI/KO

Os perfis farmacocinéticos de anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12 foram determinados em camundongos transgênicos huCD52 KI/KO. Os camundongos foram injetados por via iv com anticorpos em dose de 1mg/kg, o sangue tendo sido coletado em vários momentos, iniciando duas horas a administração. Os níveis circulantes de cada anticorpo foram avaliados usando ELISA anti-Ig humana. A taxa global de depuração foi semelhante para cada um dos anticorpos humanizados anti-CD52 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12, com 2C3-SFD1/K12 exibindo cinética potencialmente mais rápida, enquanto 12G6-SFD1/K12 permaneceu presente no soro pelo período de tempo mais longo.

As Figuras 95A-95B mostram os níveis de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 9D9-H16/K13 e 12G6-SFD1/K12 no sangue sobre um período de tempo após a administração.

Exemplo 63: Avaliação de pré-tratamento com 12G6 e 2C3 em EAE em camundongos transgênicos huCD52-KI/KO

A eficácia do tratamento com anticorpo anti-CD52 em reduzir a incidência global e a gravidade de Encefalite Autoimune Experimental (EAE) foi avaliada em camundongos huCD52 KI/KO. Camundongos huCD52-KI/KO foram tratados com um ciclo de 2C3-SFD1/K12 ou de 12G6-SFD1/K12 do

Dia -5 ao Dia -1. EAE (um modelo de esclerose múltipla) foi induzida por imunização com peptídeo MOG35-55 emulsionado em CFA, e tratamento com toxina *Pertussis* nos Dia 0 e 2. Camundongos tratados com veículo começaram a exibir sinais de paralisa em 10 dias após a injeção, os quais evoluíram para doença progressiva grave. Por outro lado, o pré-tratamento com o anticorpo 2C3-SFD1/K12 ou 12G6-SFD1/K12 retardou o aparecimento da doença e diminuiu a gravidade global da doença.

A Figura 96 demonstra o escore clínico de EAE de 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K12 sobre um período de tempo de progressão da doença.

Exemplo 64: Modificação de Fc de anticorpos para alterar o perfil farmacocinético de anticorpos anti-CD52

Alterações na região Fc de anticorpos 1) afetam a atividade biológica do anticorpo ao alterarem interações com receptores Fc e/ou 2) alteram o perfil farmacocinético do anticorpo ao alterarem interações com o receptor neonatal FcRn. A molécula de FcRn é expressa em endotélio vascular e acredita-se que seja o principal sítio de reciclagem de IgG. O FcRn liga-se à parte Fc do anticorpo, o qual se torna internalizado dentro de uma célula. Anticorpos com interações de alta afinidade com o FcRn serão reciclados novamente para a superfície da célula e liberados mais uma vez na circulação. Anticorpos com interações com afinidade mais baixa dissociam-se dentro da célula e, no final, degradam-se. Mutagênese sítio-direcionada para aumentar a interação com FcRn gera um anticorpo que pode ser mantido em circulação por período de tempo mais longos, quando comparado a um anticorpo não modificado. Por outro lado, mutações dentro da região Fc de um anticorpo que diminuem a ligação a FcRn encurtam a meia-vida circulante do anticorpo. Mutações que foram descritas para diminuir a ligação a FcRn, resultando em meia-vida circulante mais curta, incluem mutação única His435Ala e a mutação dupla His310Ala/His435Gln (consultar, por exemplo, Kim et al., "Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn," Eur. J. Immunol., 29:2819-2825 (1999) e Kenanova et al., "Tailoring the Pharmacokinetics and Positron Emission Tomography

Imaging Properties of Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments," Cancer. Res. 65(2):622-631 (2005)).

O anticorpo 2C3-SFD1/K12 foi modificado por mutação para gerar anticorpos His435Ala 2C3-SFD1/K12 ("2C3-SFD1/K12-Modificado 1") e 5 His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 ("2C3-SFD1/K12-Modificado 2") com perfis PK alterados. A análise Biacore foi conduzida para confirmar a diminuição da ligação a moléculas de camundongo e humana de FcRn. Ambos os anticorpos Campath-1H® e 2C3-SFD1/K12 ligaram-se a cada molécula, de camundongo e humana, de FcRn com cinética semelhante. Por outro lado, 10 anticorpos His435Ala 2C3-SFD1/K12 ligaram-se em níveis baixos à molécula de camundongo FcRn, mas não a FcRn humana. Os anticorpos His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 não se ligaram à molécula de camundongo ou humana de FcRn, indicando que a incorporação da mutação única ou dupla na região Fc de 2C3-SFD1/K12 Fc afeta significativamente a ligação 15 a FcRn de camundongo e humana.

As Figuras 97A-97B demonstram a capacidade de Campath1H® ("Campath"), 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), His435Ala 2C3-SFD1/K12 ("H435A 2C3") e His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 ("H310A/H435Q 2C3") ligarem-se a moléculas de camundongo e humanas de FcRn.
20 Exemplo 65: Avaliação da meia-vida de anticorpos Fc modificados anti-CD52 após administração i.v. em camundongos C57Bl/6

Modificações em Fc foram incorporadas na cadeia principal de 2C3-SFD1/K12 para gerar os anticorpos 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 que exibiam ligação diminuída ao receptor de FcRn, 25 responsável por manter anticorpos em circulação. O perfil farmacocinético foi determinado para o anticorpo 2C3-SFD1/K12 e os anticorpos 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 com ligação diminuída a FcRn. Camundongos C57BL/6 foram usados para avaliar o perfil PK na ausência de antígeno-alvo (2C3-SFD1/K12 liga-se à CD52 humana, mas 30 não reage cruzado com CD52 de camundongo). Os camundongos foram injetados por via iv com anticorpos em dose de 1 mg/kg. Em vários momentos, sangue foi coletado para analisar o nível de IgG1 humana circulante no

soro do camundongo por ELISA. Ambos anticorpos, 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2, foram depurados do sangue mais rápido do que o anticorpo 2C3-SFD1/K12. 2C3-SFD1/K12 exibiu meia-vida de 403 horas, enquanto 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 exibiu meia-vida de 51 horas e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2, de 8 horas. Os perfis PK de 2C3-SFD1/K12 e 2C3-SFD1/K12-Modificado-1 foram compatíveis com modelo de 1 compartimento com somente um fase única de eliminação. Por outro lado, perfis para 2C3-SFD1/K12-Modificado-2 foram compatíveis com modelo de 2 compartimentos, com 2 fases distintas de eliminação (especificada como alfa e beta na tabela). A primeira fase durou 48 horas após a dose (alfa) e a segunda fase (beta, também denominada fase de eliminação terminal) iniciou 48 horas após a dose.

A Figura 98 mostra a depuração *in vivo* de 2C3-SFD1/K12 ("2C3 não modificado"), 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ("2C3-Fc mutante 1") e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 ("2C3-Fc mutante 2") em camundongos não transgênicos.

Tabela 17-Sumário de dados farmacocinéticos entre grupos

	2C3-SFD1/K12	2C3-SFD1/K12-Modificado 1	2C3-SFD1/K12-Modificado 2
t _{1/2} (h)	403 ± 140	51,0 ± 12,3	8,05 ± 0,74 (Alfa)
			282 ± 385 (Beta)
Cl (ml/h/kg)	0,29 ± 0,09	1,35 ± 0,36	5,90 ± 4,67
Vz (ml/kg)	156 ± 40,7	94,8 ± 14,3	1932 ± 1341
AUC (ug*h/ml)	3748 ± 937	781 ± 171	230 ± 105
Cmax (ug/ml)	9,65 ± 1,72	11,9 ± 0,83	9,64 ± 3,70

Tabela 18 -Dados individuais de animais

Grupo nº	Animal	HL_Lambda_z (h)	Cmax (ug/ml)	AUCINF_obs (h*ug/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/h/kg)
2C3	2,1	197,26	11,56	2967,86	95,89	0,34
2C3	2,2	494,01	10,54	4635,96	153,73	0,22
2C3	2,3	324,61	10,06	3783,76	123,77	0,26
2C3	2,4	283,68	10,57	3130,92	130,72	0,32
2C3	2,5	330,89	6,15	2025,29	235,71	0,49
2C3	2,6	547,78	10,56	4469,73	176,81	0,22
2C3	2,7	597,92	10,57	4764,75	181,04	0,21
2C3	2,8	320,65	7,61	3415,82	135,43	0,29
2C3	2,9	527,01	9,27	4533,82	167,70	0,22
	AVG	402,65	9,65	3747,55	155,64	0,29
	SD	140,22	1,72	937,38	40,73	0,09

Grupo nº	Animal	HL_Lambda_z (h)	Cmax (ug/ml)	AUCINF_obs (h*ug/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/h/kg)
2C3-M1	3,1	35,20	12,84	513,50	98,89	1,95
2C3-M1	3,2	42,74	11,68	842,55	73,17	1,19
2C3-M1	3,3	50,55	11,39	902,62	80,80	1,11
2C3-M1	3,4	46,61	12,49	717,95	93,67	1,39
2C3-M1	3,5	56,38	12,94	911,32	89,26	1,10
2C3-M1	3,6	63,40	12,41	995,22	91,91	1,00
2C3-M1	3,7	33,86	12,02	513,17	95,19	1,95
2C3-M1	3,8	63,14	10,56	842,79	108,08	1,19
2C3-M1	3,9	66,75	11,02	788,59	122,12	1,27
	AVG	50,96	11,93	780,86	94,79	1,35
	SD	12,30	0,83	170,51	14,33	0,36

Grupo nº	Animal	Alpha_HL_Lambda (h)	Beta_HL_Lambda (h)	Cmax (ug/ml)	AUCINF_obs (h*ug/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/h/kg)
2C3-M2	4,1*	8,31	Faltando	10,62	177,07	67,74	5,65
2C3-M2	4,2	7,42	994,71	11,35	390,03	3679,37	2,56
2C3-M2	4,3	7,37	703,09	10,48	315,82	3211,80	3,17
2C3-M2	4,4	7,72	227,03	11,78	247,96	1320,92	4,03
2C3-M2	4,5**	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,6**	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,7***	77,89	77,89	1,32	61,71	1820,87	16,20
2C3-M2	4,8	8,18	150,98	11,41	221,89	981,64	4,51
2C3-M2	4,9	9,33	77,61	10,49	194,31	576,21	5,15
	AVG	8,05	281,98	9,64	229,83	1931,80	5,90
	SD	0,74	384,82	3,70	104,69	1341,43	4,67

nº –Os grupos testados foram 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ("2C3-M1") e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 ("2C3-M2")

5 *Animal 4.1 sem beta t1/2, fora do limite Vz

** - Animais 4.5 e 4.6, dados insuficientes para análise de PK.

***Animal 4.7 injeção incompleta.

Exemplo 66: Avaliação da meia-vida de anticorpos Fc modificados anti-CD52 após administração i.v. em camundongos transgênicos huCD52 heterozigotos

10 tos

O perfil farmacocinético foi determinado para o anticorpo 2C3-SFD1/K12 e os anticorpos 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 com ligações reduzidas a FcRn *in vitro*. Camundongos transgênicos huCD52 foram usados para avaliar o perfil PK na presença do antígeno-alvo do anticorpo 2C3-SFD1/K12. Os camundongos foram injetados por via iv com anticorpos na dose de 1 mg/kg. Em vários momentos, sangue foi coletado para determinar o nível de IgG1 humana circulante no soro do

camundongo por ELISA. Os dois anticorpos, 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2, foram depurados do sangue mais rápido do que o anticorpo 2C3-SFD1/K12. 2C3-SFD1/K12 exibiu meia-vida de 64 horas, enquanto 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 exibiu meia-vida de 32 horas e 5 2C3-SFD1/K12-Modificado 2, de 6,5 horas.

A Figura 99 mostra a depuração *in vivo* de 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 2C3-SFD1/K12 modificado 1 ("2C3-Fc mutante 1") e 2C3-SFD1/K12 modificado 2 ("2C3-Fc mutante 2") em camundongos transgênicos huCD52.

Tabela 19 - Sumário de dados farmacocinéticos entre grupos

	2C3-SFD1/K12	2C3-SFD1/K12-Modificado 1	2C3-SFD1/K12-Modificado 2
t _{1/2} (h)	64,2 ± 12,1	32,3 ± 3,25	6,58 ± 2,03
Cl (ml/h/kg)	2,15 ± 0,31	2,51 ± 0,28	5,41 ± 0,83
Vz (ml/kg)	198 ± 42,8	117 ± 21,1	49,7 ± 11,1
AUC (ug*h/ml)	475 ± 73,4	403 ± 44,5	188 ± 27,2
Cmax (ug/ml)	8,88 ± 1,69	12,4 ± 1,67	12,9 ± 1,91

10 Tabela 20 - Individual Animal Data

Grupo nº	Animal	HL_Lambda_z (h)	Cmax (ug/ml)	AUCINF_obs (h*ug/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/h/kg)
2C3	2,1	77,32	8,19	421,87	264,42	2,37
2C3	2,11	61,47	10,38	483,25	183,51	2,07
2C3	2,2	78,28	9,28	496,58	227,42	2,01
2C3	2,3	82,38	6,99	441,98	268,91	2,26
2C3	2,4	53,60	9,08	465,09	166,28	2,15
2C3	2,5	58,02	9,09	526,59	158,95	1,90
2C3	2,6	44,97	6,03	371,17	174,78	2,69
2C3	2,7	56,52	9,38	476,41	171,16	2,10
2C3	2,8	67,99	12,13	641,28	152,97	1,56
2C3	2,9	61,46	8,30	421,65	210,29	2,37
	Média	64,20	8,88	474,59	197,87	2,15
	SD	12,06	1,69	73,40	42,80	0,31

Grupo nº	Animal	HL_Lambda_z (h)	Cmax (ug/ml)	AUCINF_obs (h*ug/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/h/kg)
2C3-M1	3,1	28,48	15,19	412,41	99,64	2,42
2C3-M1	3,11	34,64	12,60	468,36	106,69	2,14
2C3-M1	3,2	27,57	14,17	411,82	96,60	2,43
2C3-M1	3,3	34,27	11,96	401,38	123,20	2,49
2C3-M1	3,4	29,10	12,51	400,36	104,85	2,50
2C3-M1	3,5	29,63	11,11	470,98	90,77	2,12
2C3-M1	3,6	32,76	9,75	348,72	135,53	2,87
2C3-M1	3,7	35,68	10,41	328,71	156,61	3,04
2C3-M1	3,8	36,41	13,52	390,24	134,61	2,56
2C3-M1	3,9	34,06	12,39	392,53	125,19	2,55
	Média	32,26	12,36	402,55	117,37	2,51
	SD	3,25	1,67	44,48	21,05	0,28

Grupo nº	Animal	HL_Lambda_z (h)	Cmax (ug/ml)	AUCINF_obs (h*ug/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/h/kg)
2C3-M2	4,1	7,64	13,45	197,24	55,85	5,07
2C3-M2	4,11	Faltando	9,00	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,2	7,79	14,92	217,80	51,61	4,59
2C3-M2	4,3	7,35	12,79	183,44	57,78	5,45
2C3-M2	4,4	3,54	10,34	152,92	33,44	6,54
2C3-M2	4,5	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,6	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,7	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,8	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
2C3-M2	4,9	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
	Média	6,58	12,10	187,85	49,67	5,41
	SD	2,03	2,40	27,23	11,12	0,83

Parâmetros PK não disponíveis para 4.11, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 devido a dados insuficientes.

nº - Os grupos testados foram 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 2C3-SFD1/K12-

5 Modificado 1 ("2C3-M1") e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 ("2C3-M2")

Exemplo 67: Avaliação de depleção *in vivo* após administração iv de anticorpos Fc modificados anti-CD52 em camundongos transgênicos huCD52 heterozigotos

A atividade de depleção foi determinada para os anticorpos 2C3-10 SFD1/K12, 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 e 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 em camundongos transgênicos huCD52. Os camundongos foram tratados com 1 mg/kg de anticorpos 2C3-SFD1/K12, 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ou 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 e avaliados quanto à presença de células T CD4, células T CD8+, células B e células NK 72 horas mais tarde. A administração 15 de anticorpos 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 ou 2C3-SFD1/K12-Modificado 2 resultou em níveis diminuídos de depleção no sangue e no baço, comparado à administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12. Além disso, 2C3-SFD1/K12-Modificado 1 induziu depleção maior do que 2C3-SFD1/K12-Modificado 2, no sangue e no baço.

- 20 As Figuras 100A-100B mostram o nível de populações de linfócitos em massa (Células T CD4+, células T CD8+, células B B220+ e células NK) no sangue e no baço após 72 horas da administração de anticorpos 2C3-SFD1/K12 ("2C3"), 2C3-SFD1/K12 modificado 1 ("2C3 Fc mutante-1") e 2C3-SFD1/K12 modificado 2 ("2C3 Fc mutante-2").

Exemplo 68: Especificidades detalhadas por epítopo de anticorpos humanizados anti-CD52

Especificidades detalhadas por epítopo dos anticorpos humanizados 12G6-SFD1/K12, 2C3-SFD1/K12 e 9D9-H16/K13 foram determinadas com equipamento Biacore T100. Como controle, a especificidade por epítopo do clone 097 (anticorpo purificado anti-CD52 humana, Biolegend) foi avaliada usando as mesmas metodologias. A especificidade por epítopo do clone 097 foi previamente caracterizada, usando um método ELISA para peptídeo (Hale G, "Synthetic peptide mimotype of the CAMPATH-1 (CD52) antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein," *Immunotechnology*, 1:175-187 (1995)). Neste ensaio Biacore T100, os anticorpos eram diretamente imobilizados em chips sensores de carboximetil dextrano da Biacore CM5 Series S (GE nº BR-1006-68), usando acoplamento de amina. A superfície de carboximetil dextrano foi ativada usando uma mistura de N-hidroxissuccinamida (NHS) 0,1 M e cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,4 M, permitindo à superfície ligar-se a grupos reativos amina nos anticorpos. Pelo fato de anticorpos IgM tenderem a apresentar nível mais alto de ligação não específica, quando comparados a IgGs, a ligação de isotipo IgMκ (mlgMκ) de camundongo como controle (Clone nº MM-30 da Biolegend) foi também investigada. Depois da imobilização do anticorpo, a reação na superfície do chip sensor reativo foi interrompida usando cloridrato de etanolamina 1 M/NaOH pH 8,5. Uma célula de fluxo em cada chip era a superfície de referência como branco, e células de fluxos subsequentes foram imobilizadas com 10.000 RU de anticorpo.

Uma série de peptídeos mutantes por varredura de alanina, compreendendo a sequência da CD52 humana (MUT 1 – MUT 12 (SEQ ID NOS: 169-180, respectivamente), Tabela 21) (consultar, por exemplo, Hale G, "Synthetic peptide mimotype of the CAMPATH-1 (CD52) antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein," *Immunotechnology*, 1:175-187 (1995)) foram sintetizados. A ligação do anticorpo a estes peptídeos mutantes de CD52 e a peptídeos do tipo selvagem de CD52 humana foi testada a concentrações de 500 nM, 100 nM, 50 nM, e 0 nM. Os peptí-

deos foram diluídos no tampão de corrida do ensaio, HBS-EP+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, P20 surfactante 0,05%, EDTA 3 mM, pH 7,4). Amostras de 100 nM em duplicata foram incluídas. O anticorpo de cadeia leve (kappa) específica de rato anti-IgM de camundongo (Southern Biotech, Clone nº 1B4B1) foi também incluído como IgM de controle. As temperaturas d câmara de amostras do equipamento T100 e do ensaio foram definidas para 4 °C e 25°C, respectivamente. As amostras de peptídeos da CD52 humana foram injetadas por cinco minutes em vazão de 50 µL/minute para medir associação, e lavadas em HBS-EP+ por cinco minutos em vazão de 50 µL/minuto para medir dissociação. Qualquer peptídeo restante ligado à superfície do anticorpo foi removido usando uma segunda injeção por sessenta segundos de glicina-HCl 10 mM pH 2,0 em vazão de 50 µL/minuto. A análise foi realizada usando o software Biacore T100 Kinetics Evaluation v2.0 (GE Healthcare). Os dados foram ajustados para modelo de 1:1 com célula de fluxo de referência e subtração de concentração de 0 nM (subtração de dupla referência). Sensorgramas representativos de reconhecimento negativo de epítopo em peptídeo de anticorpo 12G6-SFD1/K12 ((-, MUT 8) e positivo ((+), MUT 9) são mostrados na Figura 101A e Figura 101B, respectivamente. Os dados compilados de ligação a peptídeo estão resumidos na Tabela 21.

A especificidade previamente caracterizada de ligação do clone 097 (Hale G, "Synthetic peptide mimotype of the CAMPATH-1 (CD52) antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein," *Immunotechnology*, 1:175-187 (1995)) foi determinada revestindo placas de ELISA com peptídeos contendo os seis resíduos da parte C-terminal de CD52 humana e, em seguida, medindo a ligação do anticorpo ao peptídeo fixado. Cada resíduo foi substituído por todos os 20 aminoácidos. Como os peptídeos estão presos a uma superfície sólida neste ELISA, o ensaio pode ser mais influenciado por efeitos de avidez do que o ensaio Biacore T100 descrito neste pedido de patente, que usa um anticorpo fixo à superfície sobre a qual os peptídeos fluem. No estudo por ELISA, substituições de alanina nas posições 11 e 12 (resíduos de prolina e serina, respectivamente, no tipo selvagem) da forma madura de CD52 humana demonstraram reduzir ligação

forte do clone 097 ao peptídeo. No presente estudo Biacore T100, substituições de alanina nas posições 11 e 12 (bem como nas posições 7, 8, 9 e 10) demonstraram anular a ligação do clone 097. Os efeitos de avidez sugeridos como hipótese do ensaio ELISA representam possivelmente o motivo porque 5 o epítopo mapeado do 097 é menor quando determinado pelo método ELISA do que quando determinado pelo ensaio descrito Biacore T100.

A ligação dos anticorpos humanizados 2C3-SFD1/K12 e 12G6-SFD1/K12 à sequência de peptídeos da CD52 é sensível a substituições de alanina nas posições 7, 8 e 11, e a ligação de 9D9-H16/K13 humanizado é 10 sensível a substituições de alanina nas posições 4 e 11. Estas especificidades definidas para epítopos sobrepõem-se aos resultados observados no Exemplo 4 (resumidos na Tabela 8). Leves variações entre os resultados não são previstas, dado que o método Biacore T100, usado para medir ligação no presente caso, não foi significativamente diferente do método usado 15 no Exemplo 4. Ao contrário do presente caso, no Exemplo 4, células CHO construídas eram usadas para expressar mutantes alanina-substituídos de CD52 humana do tipo selvagem. CD52 humana expressa em tais células de mamíferos podem ser glicosiladas, afetando a ligação. Este não é o caso para a CD52 humana usada no ensaio Biacore T100.

20 Tabela 21: Ligação a peptídeos mutantes de hCD52 por varredura de alanina

Peptídeo	Sequência de peptídeo	Ligação de 2C3-SFD1/K12	Ligação de 9D9-H16/K13	Ligação de 12G6-SFD1/K12	Ligação de 097	Ligação de mlgM de controle
MUT 1	AQNDTSQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 2	GANDTSQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 3	GQADTSQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 4	GQNATSQTSSPSADC	+	-	+	+	-
MUT 5	GQNDASQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 6	GQNDTAQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 7	GQNDTSATSSPSADC	-	+	-	-	-
MUT 8	GQNDTSQASSPSADC	-	+	-	-	-
MUT 9	GQNDTSQTASPSADC	+	+	+	-	-
MUT 10	GQNDTSQTAPSADC	+	+	+	-	-
MUT 11	GQNDTSQTSSASADC	-	-	-	-	-
MUT 12	GQNDTSQTSSPAADC	+	+	+	-	-
Controles						
WT 1	GQNDTSQTSSPSADK-Biotina	+	+	+	+	-
WT 2	Biotina-GQNDTSQTSSPSAD	+	-	+	+	-
anti-mlgM de rato	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+

(+) Ligação detectada: Resposta máxima (R_{max}) > 2RUs por injeção de peptídeo a 500 nM

(-) Nenhuma ligação detectada. Resposta máxima (R_{max}) < 2RUs para injeção de peptídeo a 500nM

5 Exemplo 69: Avaliação de respostas de células T CD4+ T induzidas por Campath-1H® ou 12G6-SFD1/K12

A resposta proliferativa de células T CD4+ foi avaliada após estimulação repetida *in vitro* com células dendríticas autólogas (DC), pré-carregadas com um conjunto de peptídeos sobrepostos de 15 mer, compreendendo sequências das regiões variáveis de Campath-1H® ou do anticorpo humanizado 12G6-SFD1/K12. Esses experimentos utilizaram células T e DCs de doador humano normal. Os resultados foram medidos, quantificando a incorporação de timidina tritiada de células T CD4+ em proliferação em resposta a células apresentadoras de抗ígenos (APC) pulsados com peptídeos autólogos.

Preparo de células: PBMCs foram isoladas de um produto por aférese de doador humano normal, adquirido da BioMed Supplies (Carlsbad, CA). O rastreamento do haplotipo de HLA do sangue do doador foi realizado pela Key Biologics, LLC (Memphis, TN) (Tabela 22). PBMCs foram isoladas usando o gradiente de densidade Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) e uma série de lavagem com solução salina com tampão fosfato (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA). Células T CD4+ foram isoladas de PBMC usando o kit para isolamento de CD4+ positivas em esferas Dynal (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Células T CD4+ isoladas foram congeladas no meio Recovery Cell Culture Freezing Media (Invitrogen) e armazenadas em nitrogênio líquido. Células dendríticas (DC) foram induzidas a partir de PBMCs, semeando células aderentes com GM-CSF (Leukine, Bayer, Leverkusin, Alemanha) e IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) por seis dias. Meio suplementado com seis GM-CSF e IL-4 foi reposto no Dia 4. As DCs foram subsequentemente isoladas dos frascos e congeladas no meio de congelamento Freezing Media, em seguida transferidas para tanques de nitrogênio para armazenamento.

Tabela 22: Haplótipo de HLA de doadores de sangue

Doador	Haplótipo de HLA DR		Conjunto de peptídeos
BMS170	DRB1_0701	DRB1_1503	Campath
BMS154	DRB1_0301	DRB1_0302	Campath
BMS150	DRB1_1101	DRB1_1302	Campath
BMS167	DRB1_0701	DRB1_1503	Campath
BMS200	DRB1_0804	DRB1_1202	Campath
BMS301	DRB1_1401	DRB1_1503	Campath
BMS352	DRB1_0301	DRB1_1101	Campath
BMS362	DRB1_0302	DRB1_0302	Campath
BMS484	DRB1_0103	DRB1_1201	Campath/GLD52
BMS486	DRB1_1302	DRB1_1303	Campath/GLD52
BMS640	DRB1_0301	DRB1_1302	GLD52
BMS656	DRB1_301	DRB1_1101	GLD52
BMS902	DRB1_0302	DRB1_0804	GLD52
BMS928	DRB1_1001	DRB1_1503	GLD52
BMS927	DRB1_1001	DRB1_1503	GLD52
BMS963	DRB1_0302	DRB1_1401	GLD52
BMS361	DRB1_1102	DRB1_1401	GLD52
BMS165	DRB1_1102	DRB1_1501	GLD52

Peptídeo: Peptídeos abrangendo as regiões variáveis da cadeia pesada e da leve de Campath-1H® e de 12G6-SFD1/K12 foram sintetizados, usando um sintetizador automático de peptídeo Rainin Symphony e usando química Fmoc padrão em resina CLEAR (Peptides International, Louisville, KY). Aminoácidos (EMD Biosciences, San Diego, CA ou Anaspec, San Jose, Ca) foram protegidos ortogonalmente com grupos tert-Butoxicarbonila (BOC), tert-Butila (tBu), 2,2,4,6,7-Pentametildihidro-benzofuran-5-sulfonila (Pbf) ou Tritila (Trt). Acoplamentos foram realizados usando um aminoácido/HCTU/HOBt/DIEA/resina com razão molar de 6:6:3:12:1. Uma solução de Piperidina 20% e 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) 2,5% em DMF foi usada para remover Fmoc do terminal amino durante cada ciclo. A resina foi desprotegida/clivada usando um coquetel de resina 15 mL/0,1 mM em razão v/v de água 2,5%/TIS 2,5%/Anisol 5%/TFA 90% por 3 horas. O sobrenadante foi precipitado em éter dietílico (-80 °C) e transformado em grânulo a 3000 rpm por 10 minutos. O éter foi decantado e o grânulo foi lavado novamente. O peptídeo bruto foi então lyophilizado. HPLC analítica (XBridge C18 4,5 x 100 mm, Waters Corp., Milford, MA) e espectrometria de massa MALDI-TOF

(Synapt, Waters Corp., Milford, MA) foram usadas para verificar as sequências e avaliar a pureza. Todos os reagentes eram de grau HPLC (EMD Biosciences, San Diego, Ca ou Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Peptídeos liofilizados foram ressuspensos em DMSO 100% DMSO (Sigma). Quarenta e três peptídeos de Campath-1H® foram combinados em 11 grupos lineares, cada um contendo 3 ou 4 peptídeos por grupo (Tabela 23: de cima para baixo, peptídeos de cadeia leve são indicados pelas SEQ ID NOs: 187-206 e peptídeos de cadeia pesada são indicados pelas SEQ ID NOs: 207-229). Os 42 peptídeos de 12G6-SFD1/K12 foram combinados em 8 grupos lineares, cada um contendo cinco ou seis peptídeos por grupo (Tabela24: de cima para baixo, peptídeos de cadeia leve são indicados pelas SEQ ID NOs: 230-250 e peptídeos de cadeia pesada são indicados pelas SEQ ID NOs: 251-271).

Tabela 23: 43 peptídeos de 15 mer de cadeia pesada e cadeia leve de Campath-1H®, sobrepostos por 10 aminoácidos cada de Peptídeos de Campath-1H®

Cadeia pesada**Cadeia leve****C1H Peptides**

light chain		heavy chain	
Peptide	ID#	Peptide	ID#
DIQMTQSPSSLSASV	978	QVQLQESGPGLVRPS	998
QSPSSLSASVGDRV	979	ESGPGLVRPSQTL	999
LSASVGDRVITITCKA	980	LVRPSQTLSLTCTVS	1000
GDRVITCKASQNI	981	QTLSLTCTVSGFTFT	1001
ITCKASQNI	982	TCTVSGFTFTDFYMN	1002
SQNI	983	GFTFTDFYMNWVRQP	1003
KYLNWYQQKPGKAPK	984	DFYMNWVRQPPGRGL	1004
YQQKPGKAPKLIYN	985	WVRQPPGRGLEWIGF	1005
GKAPKLLIYNTNNLQ	986	PGRGLEWIGFIRDKA	1006
LLIYNTNNLQTGVPS	987	EWIGFIRDKAKGYTT	1007
TNNLQTGVPSRFSGS	988	IRDKAKGYTTEYNPS	1008
TGVPSRFSGSGSGTD	989	KGYTTEYNPSVKGRV	1009
RFSGSGSGTDFTFTI	990	EYNPSVKGRVTMLVD	1010
GSGTDFTFTISSLQP	991	VKGRTVMLVDTSKNQ	1011
FTFTISSLQPEDIAT	992	TMLVDTSKNQFSLRL	1012
SSLQPEDIATYYCLQ	993	TSKNQFSLRLSSVTA	1013
EDIATYYCLQHISRP	994	FSLRLSSVTAADTAV	1014
YYCLQHISRPRTFGQ	995	SSVTAADTAVYYCAR	1015
HISRPRTFGQGTKVE	996	ADTAVYYCAREGHTA	1016
RTFGQGTKVEIKRTV	997	YYCAREGHTAAPFDY	1017
		EGHTAAPFDYWGQGS	1018
		APFDYWGQGSLTV	1019
		WGQGSLTVSSASTK	1020

Tabela 24: 42 peptídeos de 15 mer de cadeia pesada e cadeia leve de 12G6-SFD1/K12, sobrepostos por 10 aminoácidos cada de Peptídeos de 12G6-SFD1/K12

Cadeia pesada

5 Cadeia leve

G1D52 Peptides

light chain		heavy chain	
Peptide	ID#	Peptide	ID#
DIVMTQTPLSLSVTP	1027	EVQLVESGGGLVQPG	1048
QTPLSLVTPGQPAS	1028	ESGGGLVQPGGSLRL	1049
LSVTPGQPASISCKS	1029	LVQPGGSLRLSCAAS	1050
GQPASISCKSSQSLL	1030	GSLRLSCAASGFPFS	1079
ISCKSSQSLLYSNGK	1031	SCAASGFPFSNYWMN	1080
SQSLLYSNGKTYLNW	1032	GFPFSNYWMNWVRQA	1081
YSNGKTYLNWVLQKP	1072	NYWMNWVRQAPGKGL	1082
TYLNWVLQKPGQSPQ	1073	WVRQAPGKGLEWVGQ	1055
VLQKPGQSPQRILYI	1074	PGKGLEWVGQIRLKS	1056
GQSPQRILYLVSKLD	1036	EWVGQIRLKSNNYAT	1060
RLIYLVSKLDGVPD	1037	IRLKSNYYATHYAES	1061
VSKLDGVVPDRFSGS	1038	NNYATHYAESVKGRF	1062
SGVPDRFSGSGSGTD	1039	HYAESVKGRFTISRD	1063
RFSGSGSGTDFTLKI	1040	VKGRTFTISRDDSKNS	1064
GSGTDFTLKISRVEA	1041	TISRDDSKNSLYLQM	1065
FTLKISRVEAEDVGV	1042	DSKNSLYLQMNSLKT	1066
SRVEAEDVGVYYCVQ	1043	LYLQMNSLKTEDTAV	1067
EDVGVYYCVQGSHFH	1075	NSLKTEDTAVYYCTP	1068
YYCVQGSHFHTFGQG	1076	EDTAVYYCTPIDYWG	1083
GSHFHTFGQGTKLEI	1077	YYCTPIDYWGQGTTV	1084
TFGQGTKLEIKRTVA	1078	IDYWGQGTTVTVSSA	1085

Estimulação *in vitro*

Pulsos de antígeno DC e maturação: Antes do tratamento com peptídeos, DCs foram descongeladas, lavadas e semeadas em RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com Soro Humano 5% (HS, Sigma, St. Louis, MO), Penicilina-Estreptomicina 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 ng/mL de GM-CSF e 20 ng/mL de IL-4. DCs foram semeadas em 2×10^5 células/mL em 4 mL de meio em placas de cultura de tecido de 6 cavidades, e deixadas para que aderissem por 1 hora 37 °C. Depois da aderência das 10 células, 10 µg/mL (40 µg total) de cada peptídeo foram adicionados às cavidades contendo DCs, correlacionando-se 120 µg ou 160 µg de peptídeos totais a cada cavidade (grupos de 3 peptídeos ou de 4 peptídeos de Campath-1H®), ou 200 µg ou 240 µg de peptídeos totais adicionados a cada cavidade.

15

dade (grupos de 5 peptídeos ou 6 peptídeos de 12G6-SFD1/K12). 40 µg do epítopo de ligação pan-DR (PADRE) foram adicionados a uma cavidade de DCs e serviram como controle positivo, uma vez que pode ligar-se a maioria das moléculas de HLA-DR (Alexander J, et al., "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides," *Immunity*, 1:751-761 (1994)). Igualmente, 40 µg de cada um dos três peptídeos de toxoide tetânico de ligação a HLA-DR (DTIMMEPPYCKGLDIYYKA (SEQ ID NO: 183), SAMLTNLIFGPGPVLNK-NEV (SEQ ID NO: 184) e NNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 185))

5 foram adicionados a uma cavidade de DCs. Da mesma forma, um adenovírus inativado por calor foi empregado como fonte positiva de antígeno e adicionado a uma cavidade de DCs a 1 µg/mL. Finalmente, um grupo de DCs permaneceu não pulsado com antígeno e serviu como grupo educado "nulo".

10 As DCs pulsadas com os vários抗ígenos foram incubadas por pelo menos

15 três horas a 37°C. As DCs foram então tratadas com "coquetel de citocinas de maturação", contendo 50 ng/mL de TNF-α, 10 ng/mL de IL-6, 25 ng/mL de IL-1beta (Peprotech, Rocky Hill, NJ) e 500 ng/mL de PGE-2 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). As DCs pulsadas com antígeno foram deixadas para que maturassem durante a noite a 37°C.

20 Estabelecimento de cocultura: Após a carga de peptídeos e a maturação, as DCs foram lavadas duas vezes com PBS e reabastecidas com 4 mL de RPMI, suplementado com HS 10%. Células T CD4+ autólogas foram descongeladas e ressuspensas a 2×10^6 células/mL em RPMI suplementado com HS 10%, Penicilina e Estreptomicina. As DCs foram cultivadas

25 em seguida com células T CD4+ virgens em proporção de 10:1 célula T:DC (8×10^6 células T: 8×10^5 DCs) em 8 mL de meio. A cocultura foi então incubada a 37°C por 7 dias. Aproximadamente 72 horas após o início da cocultura, as células foram suplementadas com 25 IU de IL-2 recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ), e ainda suplementadas com 25 IU de IL-2 recombinante em meio fresco a cada 3-4 dias posteriormente.

30 Re-estimulação de cocultura: No Dia 7 (Stim nº 2) e Dia 14 (Stim nº 3), as coculturas foram re-estimuladas seguindo o procedimento acima.

Ensaio de proliferação: DCs foram semeadas, pulsadas com antígeno e maturadas como informado acima, a 5×10^5 células/mL em 1 mL de meio em placas de ligação baixa de 24 cavidades para facilitar a transferência subsequente de células para placas de ensaio com fundo em U. Um peptídeo de ligação irrelevante HLA_DR, CS 378-398 (sequência do peptídeo: DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS (SEQ ID NO: 186)), foi usado como controle negativo (Alexander J, et al., "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides," *Immunity*, 1:751-761 (1994)). Depois de maturação de DCs por 24 horas, as células foram destacadas das placas usando lavagens com PBS gelado. As DCs foram semeadas em placas de 96 cavidades com fundo em U, junto com células T estimuladas com antígeno em proporção de 1:1 célula T:DC ($2,5 \times 10^4$ DC/cavidade). Cada grupo de células T foi analisado em triplicata com DC pulsada com o(s) peptídeo(s) educador(es) (resposta específica) e DC pulsada com peptídeo irrelevante (resposta não específica), bem como controles com apenas células T e com apenas DCO ensaio prosseguiu por 72 horas antes que fosse adicionado timidina tritiada 1 uCi por cavidade (Perkin Elmer, Waltham, MA). As células foram colhidas em coletor de placa de 96 cavidades (Perkin Elmer), e a quantidade de timidina tritiada incorporada foi quantificada por CPM, medida em contador Wallac Microbeta Trilux (Perkin Elmer). O índice de estimulação foi calculado dividindo a CPM específica pela CPM não específica.

Uso de V beta em receptor de células T (TCR): Células T CD4+ que ainda restassem após estabelecimento do ensaio de proliferação foram coletadas para determinação final de expressão de cadeia V beta em receptor de células T. As células foram descongeladas e coradas com anticorpos reconhecendo 24 membros conjugados da família V beta por 30 minutos, seguido as orientações do fabricante no Kit IOTest Beta Mark (Beckman Coulter, França). Após lavagem com PBS e ressuspensão com formaldeído 1%, as células foram analisadas em FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). O percentual de células expressando cada uma das cadeias V beta detectadas foi calculado, como resumido na Figura 102 e Figura 103.

Campath-1H® Avaliação de imunogenicidade

A avaliação de imunogenicidade de peptídeos de Campath-1H® foi realizada como descrito acima, usando PBMCs de dez doadores normais, da BioMedSupply (BMS). O sumário das respostas, indicadas pelo índice de estimulação, está retratado na Tabela 25A. Cada doador é listado em uma coluna, e cada linha lista o grupo de peptídeos usados para estimular células T CD4+. O Índice de Estimulação (SI) é determinado dividindo a resposta imune específica ao grupo peptídico educador por uma resposta irrelevante. Valores de SI < 2,0 não estão listados. Os dados sobre proliferação de cada um dos dez doadores estão resumidos na Tabela 25A e são relatados na Figura 104A-J. Seis doadores exibiram índice de estimulação acima de 2,0 e foram denominados, como resultado, "respondedores de Campath-1H®". Células T CD4+ educadas de um dos respondedores, BMS352, exibiram resposta imunes específicas quando analisadas com dois grupos peptídicos diferentes. Um sétimo doador, BMS486, foi classificado também como "respondedor". Neste doador, um índice de estimulação 1,7 vezes o fundo foi registrado com o grupo de peptídeos 986-989 da cadeia leve. Quando a regulação positiva de V beta foi analisada nas culturas de células T educadas neste doador, foi demonstrado que as células T educadas para 986-989 exigiam alta regulação positiva de um único V beta, V β 3 (Figura 102). A regulação positiva de um único V beta e a resposta proliferativa específica indicaram que BMS486 era respondedor de Campath-1H®. Os três doadores não respondedores, BMS200, BMS154 e BMS167, não mostraram dados proliferativos ou regulação positiva de V beta, indicando que uma resposta imune específica para peptídeo não ocorreu. Os dados de Campath-1H® foram quantificados em taxa de 70% (7/10) de respondedores. O número total de grupos peptídicos provocando resposta imune foi oito. Três destes oito grupos peptídicos imunogênicos provocaram fortes respostas nos respectivos doadores com índices de estimulação de 3,0 ou acima (Tabela 26).

Tabela 25: Sumário de dados de índice de estimulação

Tabela 25B: Índice de estimulação de 12G6-SFD1/K12

Exemplo 70: Avaliação de respostas de células T CD4+ induzidas por 12G6-SFD1/K12

Avaliação de imunogenicidade e análise V beta da região variável de 12G6-SFD1/K12 foram realizadas como descrito no Exemplo 69 para 5 Campath-1H®, empregando células de dez doadores normais. Os dados sobre proliferação para cada um dos dez doadores, resumidos na Tabela 25B, são relatados na Figura 105A-J. Dois destes dez doadores foram usados também na avaliação de Campath-1H® descrita acima (BMS486 e BMS484), enquanto os demais oito doadores foram testados somente com 10 os peptídeos de 12G6-SFD1/K12. Um doador, BMS484, respondeu a grupos peptídicos e foi classificado "respondedor de 12G6-SFD1/K12" (Tabela 25B). Dois doadores, BMS927 e BMS928, responderam cada um a um grupo de peptídeos e foram, portanto, classificados como respondedores. O doador BMS928 mostrou índice fraco de estimulação de 2,0 ao grupo contendo os 15 peptídeos de cadeia pesada 1066, 1067, 1068, 1083, 1084 e 1085. Essa resposta foi confirmada pela análise de células T proliferativas para uso de V beta. As células T com resposta ao BMS928 exibiram regulação positiva de um único V beta, V β 20 (Figura 103). O doador BMS927 mostrou índice de estimulação de 2,5 em células T educadas com um grupo de peptídeos de 20 cadeia leve. A análise de V beta das células T com resposta ao BMS927 não indicaram regulação positiva de um único V beta sobre o fundo. No entanto, este doador continua na categoria de "respondedor", uma vez que o kit de V beta representa somente 70% de todos os possíveis usos de V beta. A taxa de imunogenicidade de 12G6-SFD1/K12 nestes 10 doadores foi de 30% 25 (3/10), menos do que a metade da taxa de respondedores de Campath-1H® (70%). No total, cinco grupos de peptídeos provocaram resposta, enquanto nenhum destes cinco grupos induziu índice de estimulação acima de 3,0 (Tabela 26).

Tabela 26: Sumário de respostas imunes a Campath-1H® e 12G6-SFD1/K12

	Campath-1H®	12G6-SFD1/K12
Percentual de respondedores	70% (7/10)	30% (3/10)
Número de grupos de peptídeos provocando resposta	8	5
Grupos de peptídeos com resposta com índice de estimulação $\geq 3,0$	3/8 (38%)	0/3 (0%)

Sumário

- Peptídeos correlacionando-se com as regiões variáveis da cadeia pesada e da leve do anticorpo monoclonal humanizado anti-CD52
- 5 12G6-SFD1/K12 induziram menos respostas imunes de dez doadores (30%) do que peptídeos das regiões variáveis da cadeia pesada e da leve de Campath-1H® (70%). As respostas imunes à base de células T CD4+ que foram geradas com 12G6-SFD1/K12 foram também de magnitude menor do que as respostas induzidas por Campath-1H®.

10 A tabela a seguir lista os números de identificação de sequência usados neste relatório descritivo.

Tabela 26: Lista de SEQ ID NOs

SEQ ID NO	TIPO	DESCRIÇÃO
1	Região variável de cadeia leve (VL)	Campath-1G®
2		CF1D12
3		8G3 (camundongo)
4		4G7 (camundongo)
5		9D9 (camundongo)
6		11C11 (camundongo)
7		3G7 (camundongo)
8		5F7 (camundongo)
9		12G6 (camundongo)
10		23E6 (camundongo)
11		2C3 (camundongo)
12		7F11 (camundongo)
13		4B10 (camundongo)
14	Região variável de cadeia pesada (VH)	Campath-1G®
15		CF1D12
16		8G3 (camundongo)
17		4G7 (camundongo)
18		9D9 (camundongo)
19		11C11 (camundongo)
20		3G7 (camundongo)
21		5F7 (camundongo)
22		12G6 (camundongo)
23		23E6 (camundongo)
24		2C3 (camundongo)
25		7F11 (camundongo)
26		4B10 (camundongo)

27	CDR-1 de cadeia leve	Campath-1H®
28		CF1D12 (camundongo)
29		8G3, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7 (camundongo)
30		5F7 (camundongo)
31		12G6, 23E6, 2C3 (camundongo)
32		7F11 (camundongo)
33		4B10 (camundongo)
34		Campath-1H®
35	CDR-2 de cadeia leve	CF1D12 (camundongo)
36		8G3, 11C11, 12G6, 23E6, 2C3 (camundongo)
37		4G7 (camundongo)
38		9D9 (camundongo)
39		3G7 (camundongo)
40		5F7 (camundongo)
41		7F11, 4B10 (camundongo)
42		Campath-1H®
43	CDR-3 de cadeia leve	CF1D12, 8G3, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7, 5F7 (camundongo)
44		12G6 (camundongo)
45		23E6 (camundongo)
46		2C3 (camundongo)
47		7F11 (camundongo)
48		4B10 (camundongo)
49	CDR-1 de cadeia pesada	Campath-1H®
50		CF1D12, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7 (camundongo)
51		8G3 (camundongo)
52		5F7 (camundongo)
53		12G6 (camundongo)
54		23E6 (camundongo)
55		2C3 (camundongo)
56		7F11, 4B10 (camundongo)
57	CDR-2 de cadeia pesada	Campath-1H®
58		CF1D12 (camundongo)
59		8G3 (camundongo)
60		4G7 (camundongo)
61		9D9, 11C11, 5F7 (camundongo)
62		3G7 (camundongo)
63		12G6, 2C3 (camundongo)
64		23E6 (camundongo)
65	CDR-3 de cadeia pesada	7F11 (camundongo)
66		4B10 (camundongo)
67		Campath-1H®
68		CF1D12, 9D9 (camundongo)
69		8G3, 4G7, 11C11, 3G7 (camundongo)
70		5F7 (camundongo)
71		12G6, 23E6 (camundongo)
72		2C3 (camundongo)
73	Iniciadores de cadeia leve	7F11 (camundongo)
74		4B10 (camundongo)
75	Iniciadores de cadeia leve	ML kappa líder (iniciador forward em sequência líder)
76		FR1-ML kappa (Iniciador forward na região)

		<i>framework 1)</i>
77		ML kappa const (Iniciador <i>reverse</i> em região constante)
78		VK-MK (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
79		MKC-Const (Iniciador <i>reverse</i> em região constante)
80		MH-SP-ALT1 (iniciador <i>forward</i> em sequência líder)
81		MH-SP-ALT2 (iniciador <i>forward</i> em sequência líder)
82		MH-FR1 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
83		MH-FR1-1 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
84		MH-J2 (Iniciador <i>reverse</i> em região J)
85		MH-gamma-const (Iniciador <i>reverse</i> em região constante)
86		VH MH1 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
87		VH MH2 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
88		VH MH3 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
89		VH MH4 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
90		VH MH5 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
91		VH MH6 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
92		VH MH7 (Iniciador <i>forward</i> na região <i>framework 1</i>)
93		IgG1 (Iniciador <i>reverse</i> em região constante CH1 de IgG1 de camundongo IgG1)
94		IgG2A (Iniciador <i>reverse</i> em região constante CH1 de IgG2A de camundongo)
95		IgG2B (Iniciador <i>reverse</i> em região constante CH1 de IgG2B de camundongo)
96	VH (parcial)	4B10 (camundongo): alinhamento
97	Linhagem germinativa humana (VH)	VH3-72: alinhamento
98	VH (parcial)	4B10 (humanizado): alinhamento
99	VL de camundongo (parcial)	4B10 (camundongo): alinhamento
100	Linhagem germinativa humana (VL)	VK2-A18b: alinhamento
101	VL (parcial)	4B10 (humanizado): alinhamento
102	VL	4B10-VK1 (humanizado)
103	VH	4B10-VH1 (humanizado)
104	Peptídeos mutantes de varredura por alanina de CD52	WT
105		MUT 1
106		MUT 2
107		MUT 3
108		MUT 4
109		MUT 5
110		MUT 6

111		MUT 7	
112		MUT 8	
113		MUT 9	
114		MUT 10	
115		K/RSSQSLL/V/IXS/TN/DGXS/TYLX	
116	LC CDR-1	K/RSSQSLL/V/IHS/TNGXS/TYLN	
117		RSSQSLSVHTNGNS/TYLN	
118		XVSXXXS	
119	LC CDR-2	XVSXRXS	
120		MVSXRFS	
121		XQXXH/R/KF/L/V/IXX	
122	LC CDR-3	SQSXH/R/KF/L/V/IPX	
123		SQSXHVPF/P	
124		GFXFXXYW/YMX	
125	HC CDR-1	GFTFXXYW/YMX	
126		GFTFTDYW/YMS	
127		XIRXKXBXYXTYXXSVKG	
128	HC CDR-2	XIRXKXNXYTTEYXXSVKG	
129		FIRNKANGYTTEYXXSVKG	
130		TXXXY/F/W	
131	HC CDR-3	TRYXY/F/WFDY	
132		TRYIF/WFDY	
133	JH6	WGQGTTTVSS	
134	JK2	FGQGTKLEIK	
135	JK5	FGQGTRLEIK	
136	VH	SFD1	7F 11
137		SFD2	
138		VK2	
139	VH	SFD1	2 C 3
140		12	
141		15	
142		16	
143		17	
144		19	
145	VL	VK1	2 C 3
146		VK11	
147		VK12	
148		VK13	
149	VH	SFD1	12 G 6
150		VH10	
151		VH11	
152		VH12	
153		VK1	
154		VK10	
155	VL	VK11	12 G 6
156		VK12	
157		VK13	
158	VH	VH10	9 D 9
159		VH11	
160		VH15	
161		VH16	

162	VL	VH17	
163		VH18	
164		VK2	
165		VK12	
166		VK13	
167		VK14	
168		VK15	
169		MUT 1	
170	Peptídeos por varredura de alanina de CD52	MUT 2	
171		MUT 3	
172		MUT 4	
173		MUT 5	
174		MUT 6	
175		MUT 7	
176		MUT 8	
177		MUT 9	
178		MUT 10	
179		MUT 11	
180		MUT 12	
181		WT1	
182		WT2	
183	Toxoide tetânico HLA-Peptídeos de ligação a DR	DTIMMEPPYCKGLDIYYKA	
184		SAMLTNLIIFGPGPVLNKNEV	
185		NNFTVSFWLRVPKVSASHLE	
186	Peptídeo "irrelevante" de ligação a HLA-DR	CS 378-398	
187		978	
188		979	
189		980	
190		981	
191		982	
192		983	
193		984	
194		985	
195		986	
196		987	
197		988	
198		999	
199		990	
200	Campath-1H® LC sobrepondo-se a peptídeos de 15 mer para estudo de imunogenicidade	991	
201		992	
202		993	
203		994	
204		995	
205		996	
206		997	
207		998	
208		999	
209		1000	
210		1001	
211		1002	
212		1003	
213		1004	
214	Campath-1H® HC sobrepondo-se a peptídeos de 15 mer para estudo de imunogenicidade	1005	
215		1006	
216		1007	

217		1008	
218		1009	
219		1010	
220		1011	
221		1012	
222		1013	
223		1014	
224		1015	
225		1016	
226		1017	
227		1018	
228		1019	
229		1020	
230		1027	
231		1028	
232		1029	
233		1030	
234		1031	
235		1032	
236		1072	
237		1073	
238		1074	
239		1036	
240		1037	
241		1038	
242		1039	
243		1040	
244		1041	
245		1042	
246		1043	
247		1075	
248		1076	
249		1077	
250		1078	
251		1048	
252		1049	
253		1050	
254		1079	
255		1080	
256		1081	
257		1082	
258		1055	
259		1056	
260		1060	
261		1061	
262		1062	
263		1063	
264		1064	
265		1065	
266		1066	
267		1067	
268		1068	
269		1083	
270		1084	
271		1085	
272	HC	2C3-SFD1	2
273	LC	2C3-K12	C

			3
274	HC	7F11-SFD1	7F
275	LC	7F11-K2	11
276	HC	9D9-H16	9
277		9D9-H18	D
278	LC	9D9-K13	9
279	HC	12G6-SFD1	12
280	LC	12G6-K12	G 6
281	HC	4B10-H1	4B
282	LC	4B10-K1	10
283	HC (ácido nucleico)	2C3-SFD1	2
284	LC (ácido nucleico)	2C3-K12	C 3
285	HC (ácido nucleico)	7F11-SFD1	7F
286	LC (ácido nucleico)	7F11-K2	11
287	HC (ácido nucleico)	9D9-H16	9
288		9D9-H18	D
289	LC (ácido nucleico)	9D9-K13	9
290	HC (ácido nucleico)	12G6-SFD1	12
291	LC (ácido nucleico)	12G6-K12	G 6
292	HC (ácido nucleico)	4B10-H1	4B
293	LC (ácido nucleico)	4B10-K1	10
294	HC CDR-3	7F11-SFD2 (ARYIFFDY)	7F 11

Os ensinamentos de todas as patentes, pedidos de patentes publicados e referências citadas neste relatório descritivo são aqui incorporados em sua totalidade por referência neste pedido de patente.

Embora esta invenção tenha sido especificamente apresentada e descrita com referência a concretizações de exemplos desta, será entendido por aqueles versados no estado da técnica que várias alterações em forma e detalhes poderão ser efetuadas na mesma, sem se afastar do âmbito da invenção abrangida pelas reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve e a cadeia pesada compreendem as três regiões determinantes de complementaridade 5 (CDRs) encontradas em:
 - a) SEQ ID NOs: 3 e 16, respectivamente;
 - b) SEQ ID NOs: 4 e 17, respectivamente;
 - c) SEQ ID NOs: 5 e 18, respectivamente;
 - d) SEQ ID NOs: 6 e 19, respectivamente;
 - e) SEQ ID NOs: 7 e 20, respectivamente;
 - f) SEQ ID NOs: 8 e 21, respectivamente;
 - 10 g) SEQ ID NOs: 9 e 22, respectivamente;
 - h) SEQ ID NOs: 10 e 23, respectivamente;
 - i) SEQ ID NOs: 11 e 24, respectivamente;
 - j) SEQ ID NOs: 12 e 25, respectivamente;
 - k) SEQ ID NOs: 12 e 137, respectivamente; ou
 - 15 l) SEQ ID NOs: 13 e 26, respectivamente.
2. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana, ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que se liga ao mesmo epítopo 20 em CD52 humana que o anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno como definido na reivindicação 1.
- 25 3. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana, ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que compete ou compete de modo cruzado com o anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno como definido na reivindicação 1.
4. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende (H)-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 de cadeia pesada e (L)-CDR1, L-CDR2, e L-CDR3 de cadeia leve, cujas sequências de aminoácidos são:
 - 30 a) SEQ ID NOs: 51, 59, 69, 29, 36 e 43, respectivamente;
 - b) SEQ ID NOs: 50, 60, 69, 29, 37 e 43, respectivamente;
 - c) SEQ ID NOs: 50, 61, 68, 29, 38 e 43, respectivamente;

- d) SEQ ID NOs: 50, 61, 69, 29, 36 e 43, respectivamente;
e) SEQ ID NOs: 50, 62, 69, 29, 39 e 43, respectivamente;
f) SEQ ID NOs: 52, 61, 70, 30, 40 e 43, respectivamente;
g) SEQ ID NOs: 53, 63, 71, 31, 36 e 44, respectivamente;
5 h) SEQ ID NOs: 54, 64, 71, 31, 36 e 45, respectivamente;
i) SEQ ID NOs: 55, 63, 72, 31, 36 e 46, respectivamente;
j) SEQ ID NOs: 56, 65, 73, 32, 41 e 47, respectivamente;
k) SEQ ID NOs: 56, 65, 294, 32, 41 e 47, respectivamente; ou
l) SEQ ID NOs: 56, 66, 74, 33, 41 e 48, respectivamente.

10 5. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve e a cadeia pesada do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de:

- a) SEQ ID NOs: 3 e 16, respectivamente;
15 b) SEQ ID NOs: 4 e 17, respectivamente;
c) SEQ ID NOs: 5 e 18, respectivamente;
d) SEQ ID NOs: 6 e 19, respectivamente;
e) SEQ ID NOs: 7 e 20, respectivamente;
f) SEQ ID NOs: 8 e 21, respectivamente;
20 g) SEQ ID NOs: 9 e 22, respectivamente;
h) SEQ ID NOs: 10 e 23, respectivamente;
i) SEQ ID NOs: 11 e 24, respectivamente;
j) SEQ ID NOs: 12 e 25, respectivamente; ou
k) SEQ ID NOs: 13 e 26, respectivamente.

25 6. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida cadeia pesada e a cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos de:

- a) SEQ ID NOs: 103 e 102, respectivamente;
b) SEQ ID NOs: 136 e 138, respectivamente;
30 c) SEQ ID NOs: 137 e 138, respectivamente;
d) SEQ ID NOs: 139 e 147, respectivamente;
e) SEQ ID NOs: 149 e 155, respectivamente;

- f) SEQ ID NOs: 149 e 156, respectivamente;
- g) SEQ ID NOs: 158 e 165, respectivamente;
- h) SEQ ID NOs: 158 e 166, respectivamente;
- i) SEQ ID NOs: 159 e 165, respectivamente;
- 5 j) SEQ ID NOs: 159 e 166, respectivamente;
- k) SEQ ID NOs: 161 e 166, respectivamente; ou
- l) SEQ ID NOs: 163 e 166, respectivamente.

7. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 272 e 273, respectivamente, sem as sequências de sinalização.

10 8. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 274 e 275, respectivamente, sem as sequências de sinalização.

15 9. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 276 e 278, respectivamente, sem as sequências de sinalização.

20 10. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 277 e 278, respectivamente, sem as sequências de sinalização.

25 11. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreendem as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 279 e 280, respectivamente, sem as sequências de sinalização.

12. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve do referido anticorpo compreende as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 281 e 282, respectivamente, sem as sequências de sinalização.
13. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 102, 138, 145-148, 153-157 e 164-168.
14. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 273, 275, 278, 280 e 282, sem as sequências de sinalização.
15. Cadeia leve ou parte desta de anticorpo, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 102, 138, 145-148, 153-157, 164-168, 273, 275, 278, 280 e 282, sem as sequências de sinalização, se presentes.
16. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 103, 136, 137, 139-144, 149-152 e 158-163.
17. Anticorpo monoclonal anti-CD52 humana ou parte de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada do referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 272, 274, 276, 277, 279 e 281, sem as sequências de sinalização.
18. Cadeia pesada ou parte desta de anticorpo, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 103, 136, 137, 139-144, 149-

152, 158-163, 272, 274, 276, 277, 279 e 281, sem as sequências de sinalização se presentes.

19. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a cadeia pesada ou uma parte de ligação a antígeno desta, ou da cadeia leve ou de parte de ligação a antígeno desta de um anticorpo ou parte de ligação a antígeno deste como definido em qualquer uma das reivindicações 5 1 a 14, 16 e 17.

20. Uso de um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleotídeos de cadeia pesada e um ácido nucleico isolado 10 compreendendo uma sequência de nucleotídeos de cadeia leve, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para tratar um paciente em necessidade deste, em que a referida sequência de nucleotídeos de cadeia pesada e a sequência de nucleotídeos de cadeia leve são selecionadas a partir do grupo constituído por:

- 15 a) SEQ ID NO: 283 e SEQ ID NO: 284, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização;
- b) SEQ ID NO: 285 e SEQ ID NO: 286, respectivamente, ambas sem sequência codificadoras de peptídeos de sinalização;
- c) SEQ ID NO: 287 e SEQ ID NO: 289, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização;
- 20 d) SEQ ID NO: 288 e SEQ ID NO: 289, respectivamente, ambas sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização;
- e) SEQ ID NO: 290 e SEQ ID NO: 291, ambas, respectivamente, sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização; e
- 25 f) SEQ ID NO: 292 e SEQ ID NO: 293, ambas, respectivamente, sem sequências codificadoras de peptídeos de sinalização.

21. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende uma primeira sequência de ácido nucleico codificadora da cadeia pesada ou de parte de ligação a antígeno desta de um anticorpo monoclonal 30 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 e 17, a referida primeira sequência de ácido nucleico, ligada operacionalmente a um elemento de controle de expressão, e uma segunda sequência de nucleico co-

dificando a cadeia leve ou uma parte de ligação a antígeno desta do referido anticorpo monoclonal, a referida segunda sequência de ácido nucleico, ligada operacionalmente a um elemento de controle de expressão.

22. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de uma doença autoimune.

5 23. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de câncer.

10 24. Anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para inibir a angiogênese.

15 25. Uso do anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para tratar uma doença autoimune em um paciente em necessidade deste.

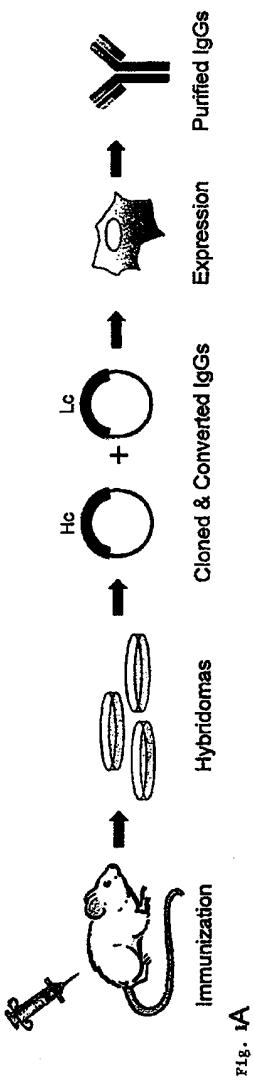
20 26. Uso do anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para tratar câncer em um paciente em necessidade deste.

27. Uso do anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para tratar um paciente em necessidade de transplante.

25 28. Uso do anticorpo monoclonal ou parte de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para tratar neovascularização em um paciente em necessidade deste.

30 29. Uso do anticorpo ou parte de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, 16 e 17, caracterizado pelo fato de ser como medicamento.

Development of New Anti-CD52 Monoclonal Antibodies



mAb	Original Isotype
4G7	mIgG ₃
9D9	mIgG ₃
7F11	mIgG ₁
4B10	mIgG _{2a}
8G3	mIgG ₃
11C11	mIgG ₁
3G7	mIgG _{2a}
12B6	mIgG ₃
5F7	mIgG ₃
23B6	mIgG ₃
2C3	mIgG ₃

Anti-CD52 Binders

FIG. 1A - 1B

Light Chain Sequences of Mouse Anti-Human CD52 Antibodies

2
G
I
T

Heavy Chain Sequences of Mouse Anti-Human CD52 Antibodies

Heavy Chain Sequence		CDR1 [- - -] [- - -]		CDR2 [- - -] [- - -]		CDR3 [- - -] [- - -]	
1)	Camp10 heavy (rat)	(S8Q ID NO:14)					
1)	CampD12 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:15)					
3)	Mouse IgG3 heavy	(S8Q ID NO:16)					
4)	Mouse IgG3 heavy	(S8Q ID NO:17)					
5)	Mouse IgG3 heavy	(S8Q ID NO:18)					
6)	Mouse IgG1.C5 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:19)					
7)	Mouse IgG2b heavy	(S8Q ID NO:20)					
8)	Mouse IgG1.1.1.4 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:21)					
9)	Mouse IgG2b.1.2 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:22)					
10)	Mouse IgG2b.2.1 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:23)					
11)	Mouse IgG2b.3.8.1 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:24)					
12)	Mouse IgE.1.9.7 IgG1 heavy	(S8Q ID NO:25)					
13)	Mouse IgG1.2 IgG3 heavy	(S8Q ID NO:26)					
[- - -] PBL1000 YPOGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIATIBINQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS							
1)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
2)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
3)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
4)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
5)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
6)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
7)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
9)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
10)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
11)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
12)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						
13)	EYLVIESGGGLYQPGSMKLS CAGSFTPSDAMDWVQSPKGLEIENITQKHNHTTAYESTKRGFTI SVDKSSKVTLQNNLAAEDTCYTC . TSH DRYNGQGTLYVSS						

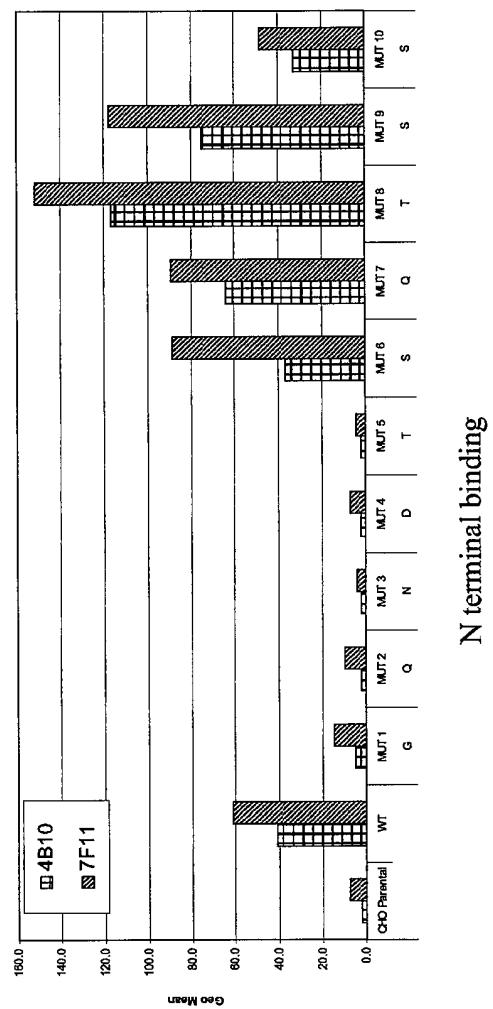
३८

Point Mutations within the CD52 Protein

WT	GQNDTSQTSSPS
MUT 1	A <u>Q</u> NDTSQTSSPS
MUT 2	<u>G</u> ANDTSQTSSPS
MUT 3	G <u>Q</u> ADTSQTSSPS
MUT 4	GQN <u>A</u> TSQ <u>T</u> SSPS
MUT 5	GQNDA <u>S</u> QTSSPS
MUT 6	GQN <u>D</u> DTA <u>Q</u> QTSSPS
MUT 7	GQN <u>D</u> TS <u>A</u> TSSPS
MUT 8	GQN <u>D</u> TS <u>Q</u> <u>A</u> SSPS
MUT 9	GQN <u>D</u> TS <u>Q</u> T <u>A</u> SPS
MUT 10	GQN <u>D</u> TS <u>Q</u> T <u>S</u> <u>A</u> PS

FIG. 4

FIG. 5A



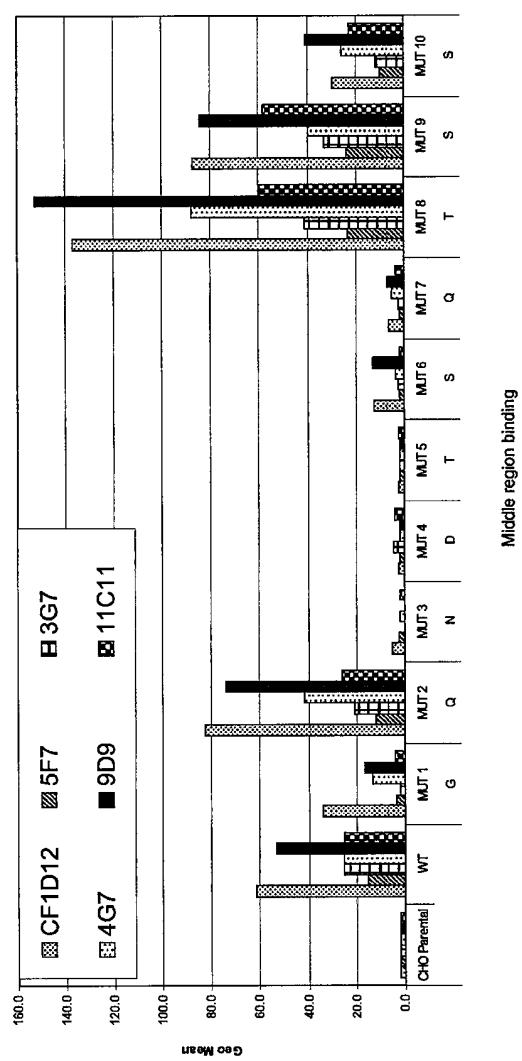
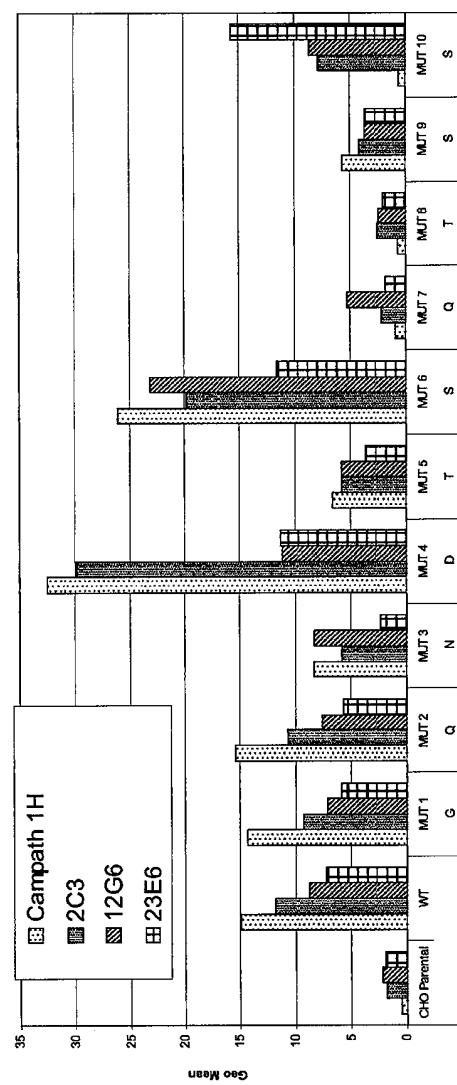


FIG. 5B

FIG. 5C



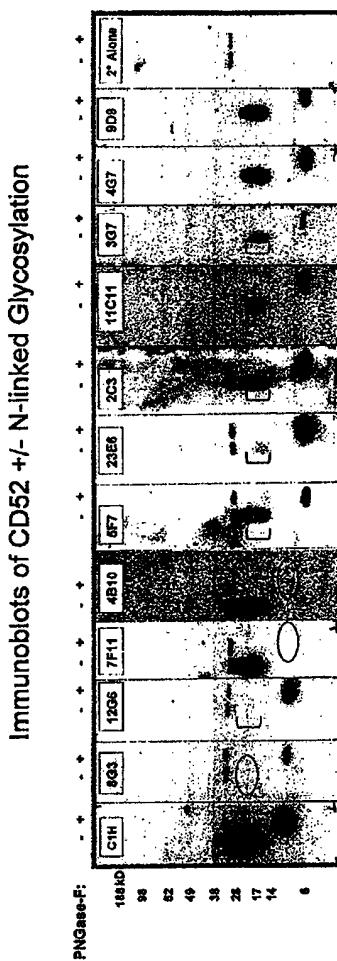


FIG. 5D

FIG. 6

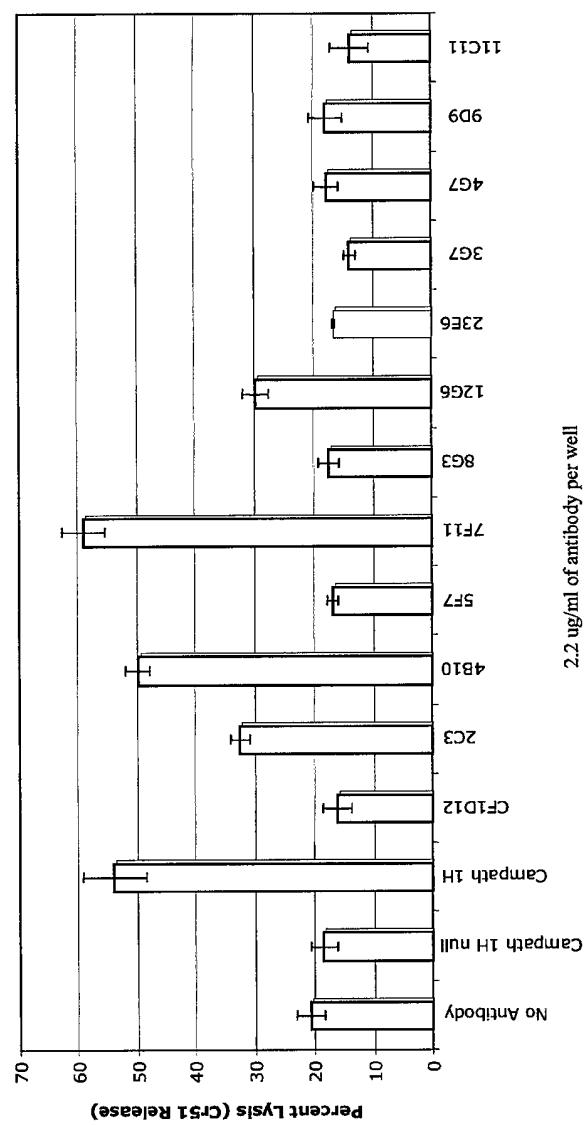


FIG. 7

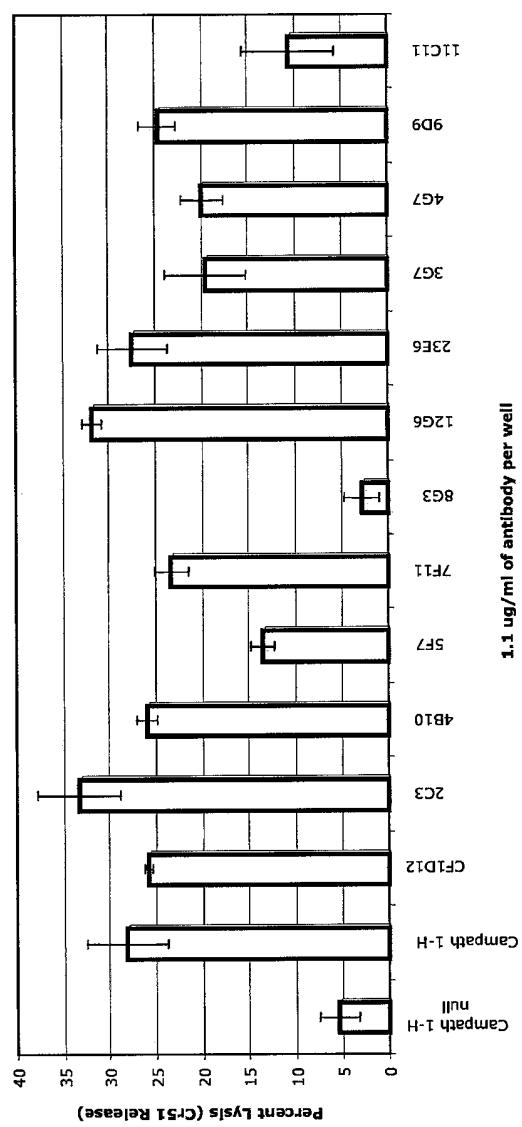
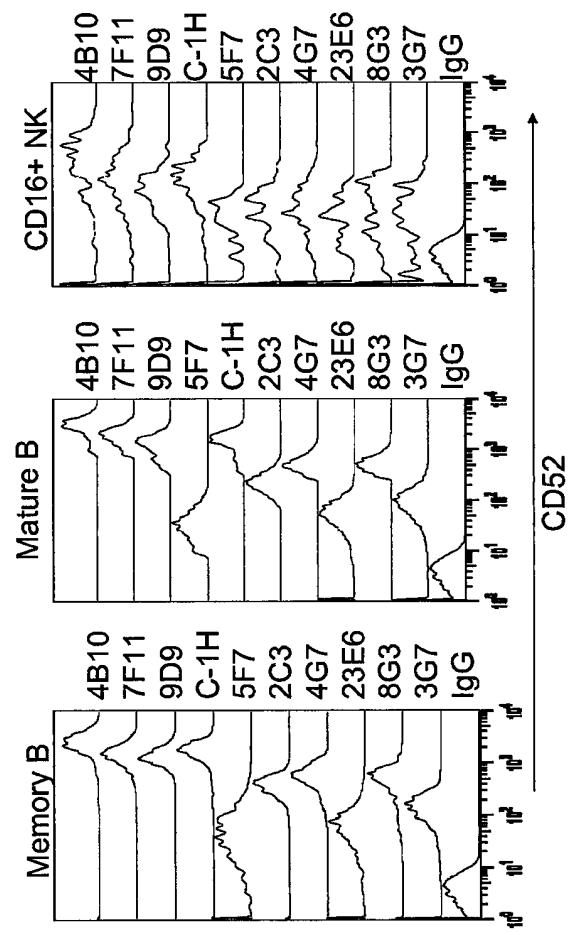


FIG. 8A



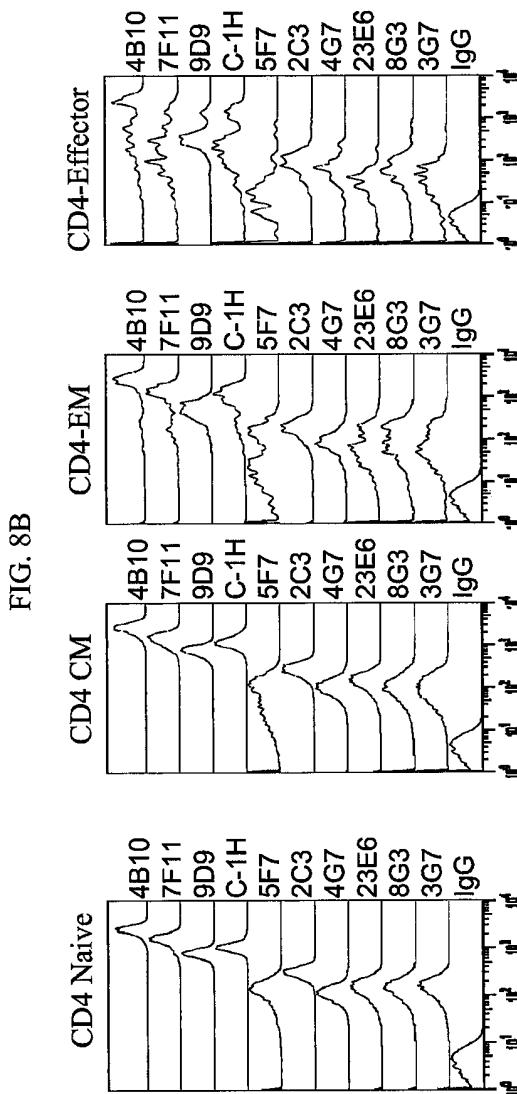
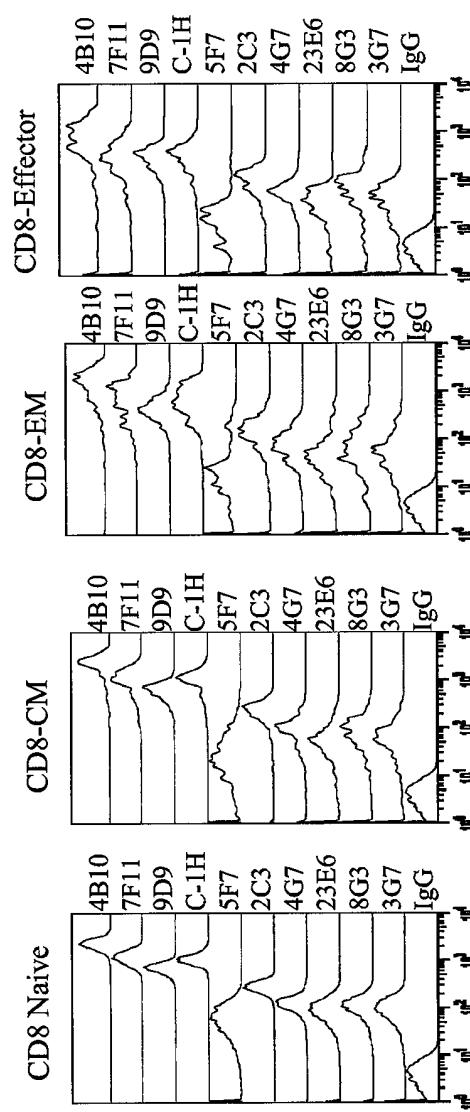


FIG. 8C



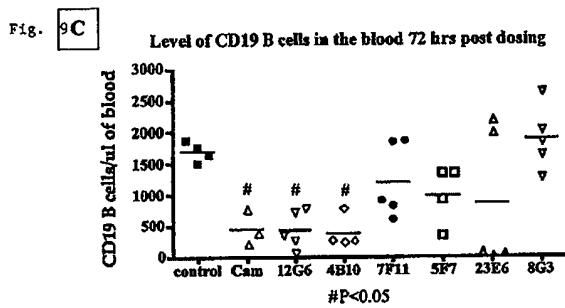
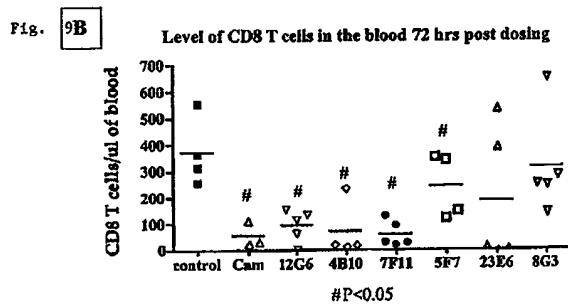
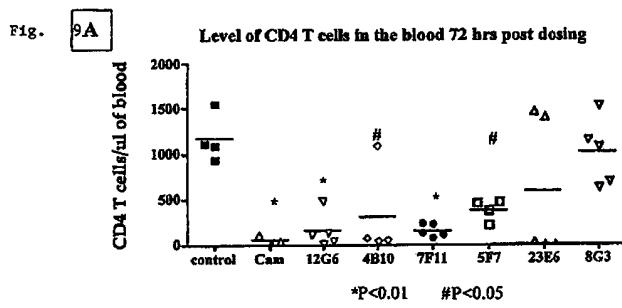
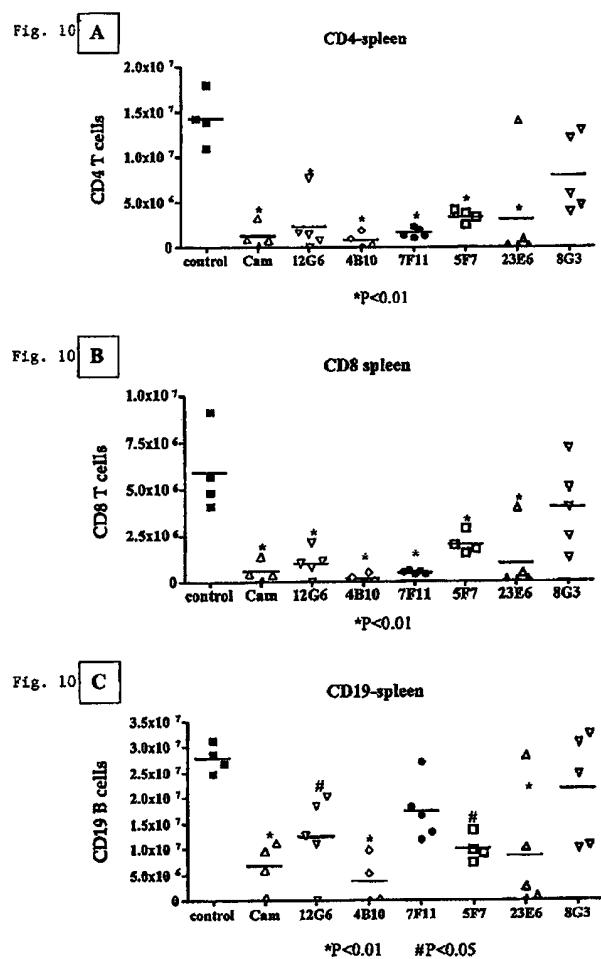


FIG. 9A - 9C

**FIG. 10A - 10C**

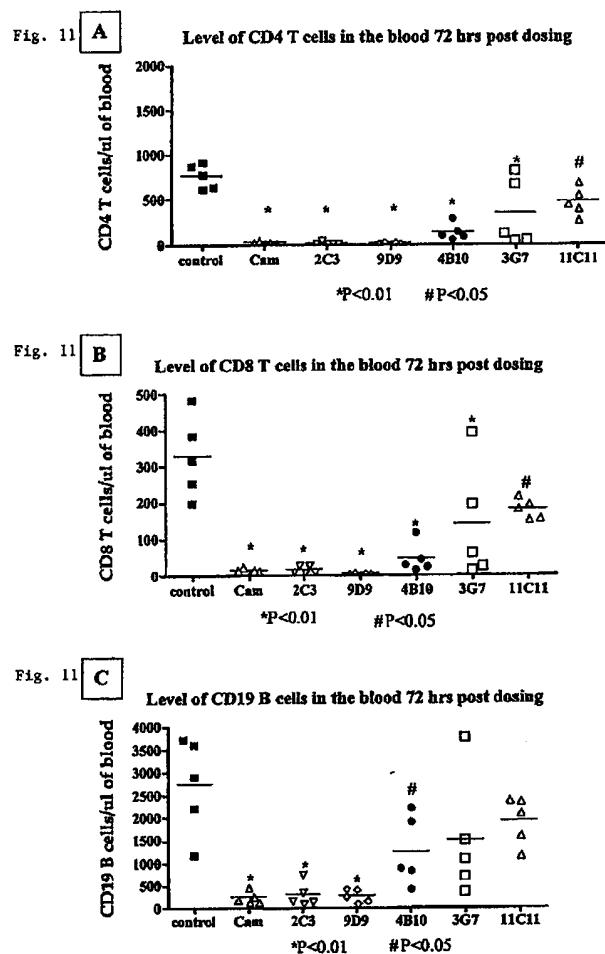


FIG. 11A - 11C

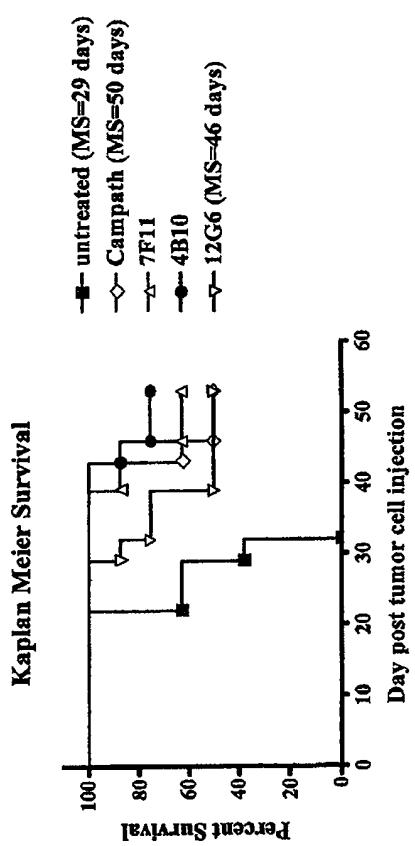


FIG. 12

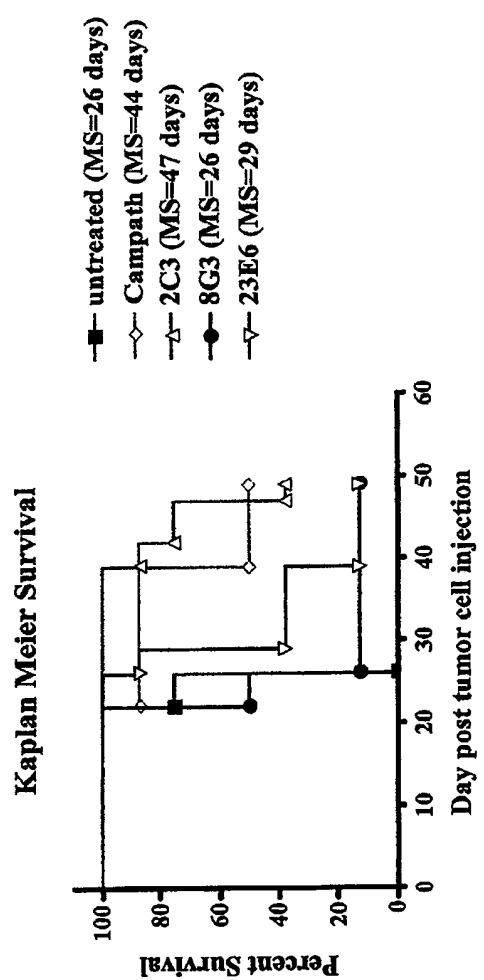


FIG. 13

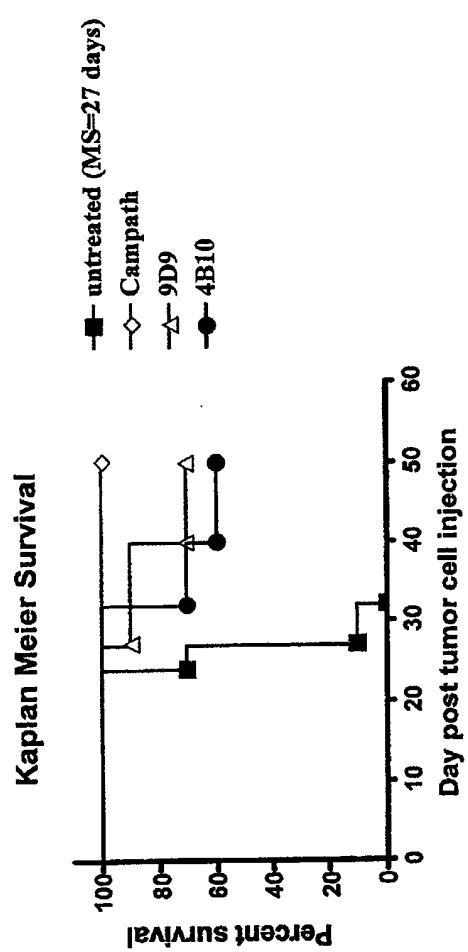


FIG. 14

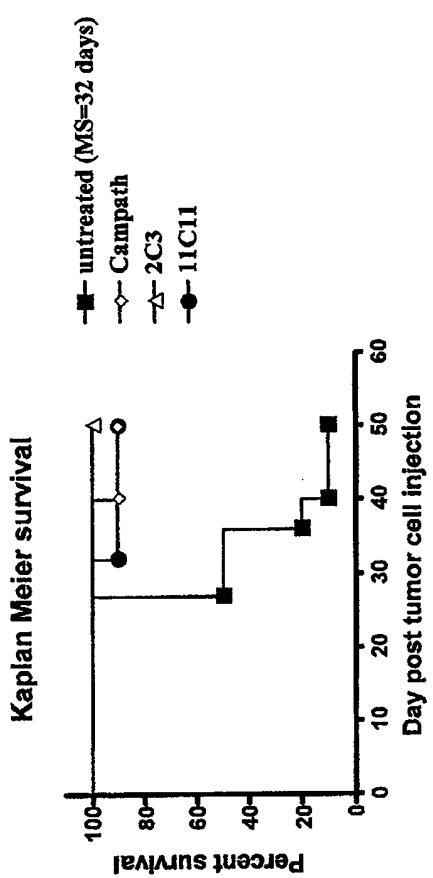


FIG. 15

**Alignment of anti human CD52 mouse(m) antibody V region with human germline(h) and
humanized anti-CD52 V region sequences**

4B10 Heavy Chain V region

4B10 Heavy chain(m)	1	EVOLVESSGGLVQPGGALSISCAAGSGFTIDYIMSWYRQPPSKALEWLGF	50	(SEQ ID NO:96)
VH3-72 germline(h)	1	EVOLVESSGGLVQPGSILRUSCAASGETSDKIMDWYRQAPSKGLEWGR	50	(SEQ ID NO:97)
4B10 humanized HC	1	EVOLVESSGGLVQPGSILRUSCAASGETSDYIMSWRQAPSKGLEWVGF	50	(SEQ ID NO:98)
***** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *				

4B10 Heavy chain(m)	51	IRKANGTYTESSAVKGRETISRDSDSOSTLYCMMNLRAEDSATVYCTR	100	
VH3-72 germline(h)	51	IRKANGTYTESSAVKGRTISRDSDSKNSLYCMMNLRAEDSATVYCAR	100	
4B10 humanized HC	51	IRKANGTYTESSAVKGRETISRDSDSKNSLYCMMNLRAEDSATVYCAR	100	
***** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *				

4B10 Light Chain V region

4B10 Light chain(m)	1	DIVMTQSPLSITVLGDQASISCRSSQSILVHTNGNTYLHWYLOKPQGSPK	50	(SEQ ID NO:99)
VR2-18b germline(h)	1	DIVMTQPLSISVTPGPASISCRSSQSILHSQDRTYLWYLOKPQGSPQ	50	(SEQ ID NO:100)
4B10 Humanized LC	1	DIVMTQPLSISVTPGPASISCRSSQSILVHTNGNTYLHWYLOKPQGSPQ	50	(SEQ ID NO:101)
***** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *				

4B10 light chain(m)	51	LLIMVSNRFSGVPDRFGSGGGTDFTLKISRVAEDIGIYFCQSARHP	100	
VK2-18b germline(h)	51	LLIEVESSRFSGVPDRFGSGGGTDFTLKISRVAEDIGVYICMQGHLP	100	
4B10 Humanized LC	51	LLIMVSNRFSGVPDRFGSGGGTDFTLKISRVAEDIGVYICQSARHP	100	
***** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *				

FIG 16

Humanized 4B10 kappa (light chain) variable region

DIVMTQTPPLSISVTPGQQPASISCRSSQSLVHTNGNTYIHWYLQKPGGSPQLLIYMSNRFSGVPDGRFSGSGTDDFTLKLISRVEAEDVGYYC
SQSAHVEPLTFGQCTRLEIK
(SEQ ID NO:102)

Humanized 4B10 heavy chain variable region

EVOLVESGGGLYDGGSLILRSCAAASGFTFSDYTMWSVRQAPGKGLEWVGFIKNKANGYTTEYASAVKGRTFISRDDSNSKNSLYLQMNSLKTDTI
AVYYCARYIWFDYNGQGTTTVSS
(SEQ ID NO:103)

FIG 17

FIG. 18

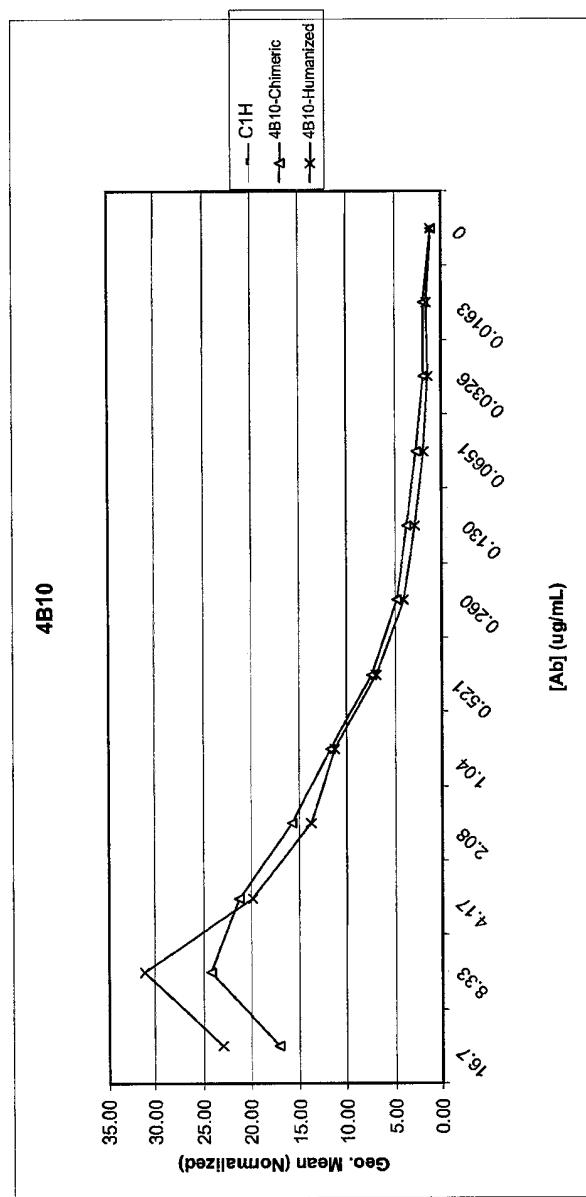


FIG. 19

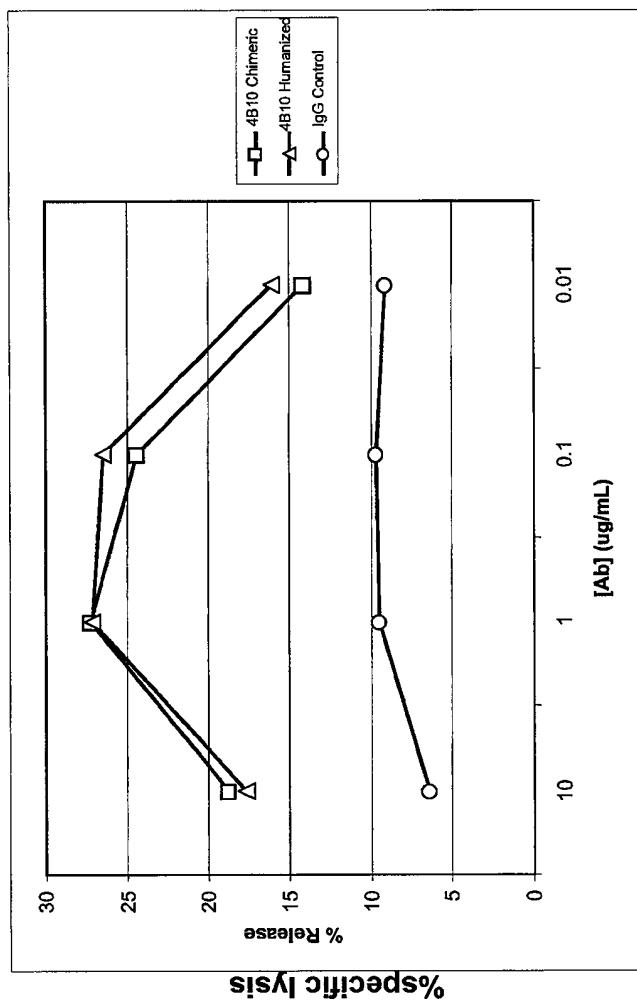


FIG.20

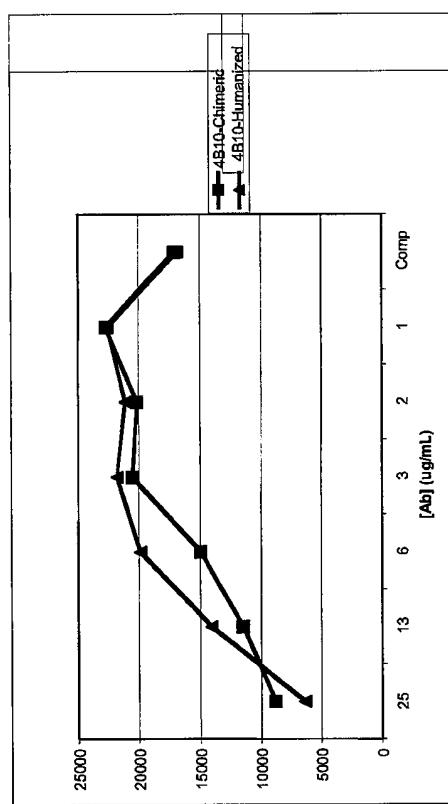
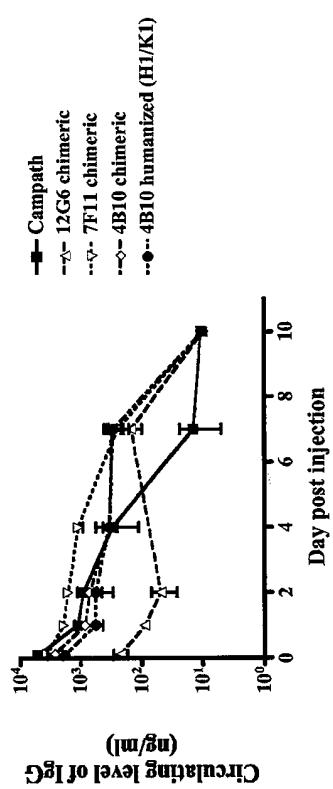


FIG. 21



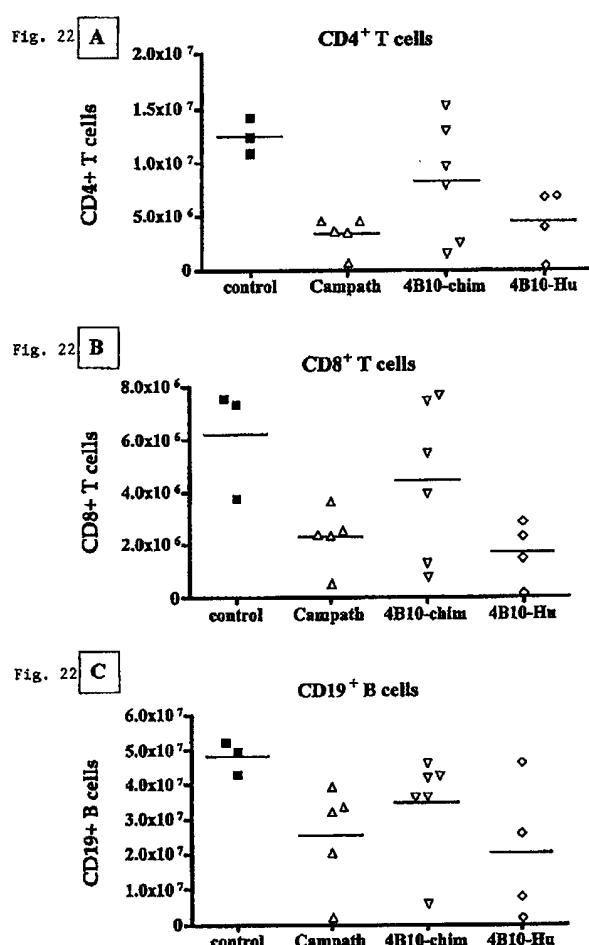


FIG. 22a - 22c

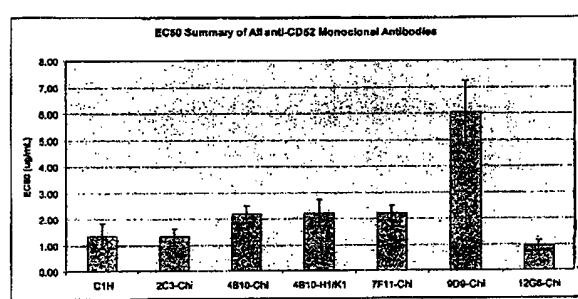


FIG. 23

Humanized 7F11 clone heavy chain variable region sequences

7F11-SFD1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVG**FIRNK**
ANGYTTEYNASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRYIFFDYWG
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 136)

7F11-SFD2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVG**FIRNK**
ANGYTTEYNASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARYIFFDYWG
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 137)

Humanized 7F11 clone light (kappa) chain variable region sequence

7F11-VK2

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNSYLHWYLQKPGQSPQLLIYMV
SNRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEADVGVYYCSQSTHVPFTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 138)

FIG. 24

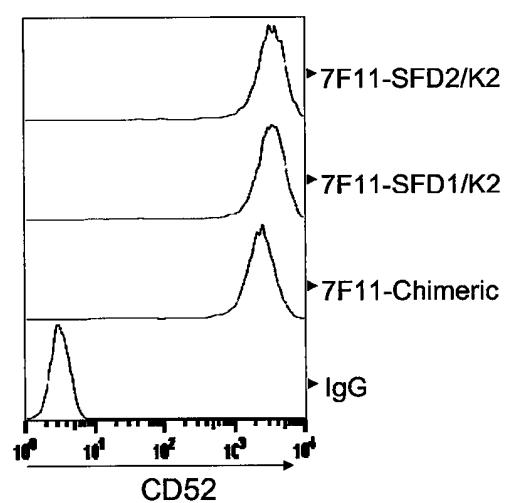


FIG. 25

Humanized 2C3 clone heavy chain variable region sequences

2C3-SFD1
EVQLVESGGGLYQPGSRLSCAASGFTFNTYWMNWRQAPGKGLEWVQIRLKSNNYATHYAESVKGRTFISRDSKNSLYQM
NSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQTTTVSS (SEQ ID NO: 139)

2C3-VH12
EVQLVESGGGLYQPGSRLSCAASGFTFNTYWMNWRQAPGKGLEWVQIRLKSNNYATHYAESVKGRTFISRDSKNSLYQM
MNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQTTTVSS (SEQ ID NO: 140)

2C3-VH15
EVQLVESGGGLYQPGSRLSCAASGFTFNTYWMNWRQAPGKGLEWVQIRLKSNNYATHYAESVKGRTFISRDSKNSLYQM
NSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQTTTVSS (SEQ ID NO: 141)

2C3-VH16
EVQLVESGGGLYQPGSRLSCAASGFTFNTYWMNWRQAPGKGLEWVQIRLKSNNYATHYAESVKGRTFISRDSKNSLYQM
MNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQTTTVSS (SEQ ID NO: 142)

2C3-VH17
EVQLVESGGGLYQPGSMLSCAASGFTFNTYWMNWRQAPGKGLEWVQIRLKSNNYATHYAESVKGRTFISRDSKNSLYQM
MNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQTTTVSS (SEQ ID NO: 143)

2C3-VH19
EVQLVESGGGLYQPGGSMRSCAASGFTFNTYWMNWRQAPGKGLEWVQIRLKSNNYATHYAESVKGRTFISRDSKNSLYQM
MNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQTTTVSS (SEQ ID NO: 144)

FIG. 26A

Humanized 2C3 clone light (kappa) chain variable region sequences

2C3-VK1
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWYLLQKPGOSPQLIYLVSKLDSCGVPDFSGSGSTDFTLKISRVEAE
DVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 145)

2C3-VK11
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWYLLQKPGOSPQLIYLVSKLDSCGVPDFSGSGSTDFTLKISRVEAE
DVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 146)

2C3-VK12
DIVMTQTPLSLSVTPGQP^ySICKSSQSLLYSNGKTYLNW^yLLQKPGOSPQLIYLVSKLDSCGVPDFSGSGSTDFTLKISRVEAE
DVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 147)

2C3-VK13
DIVTQTPLSLSVTPGQP^ySICKSSQSLLYSNGKTYLNW^yLLQKPGQSP^xKRUYLVSKLDSCGVPDFSGSGSTDFTLKISRVEAE
DVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 148)

FIG. 26B

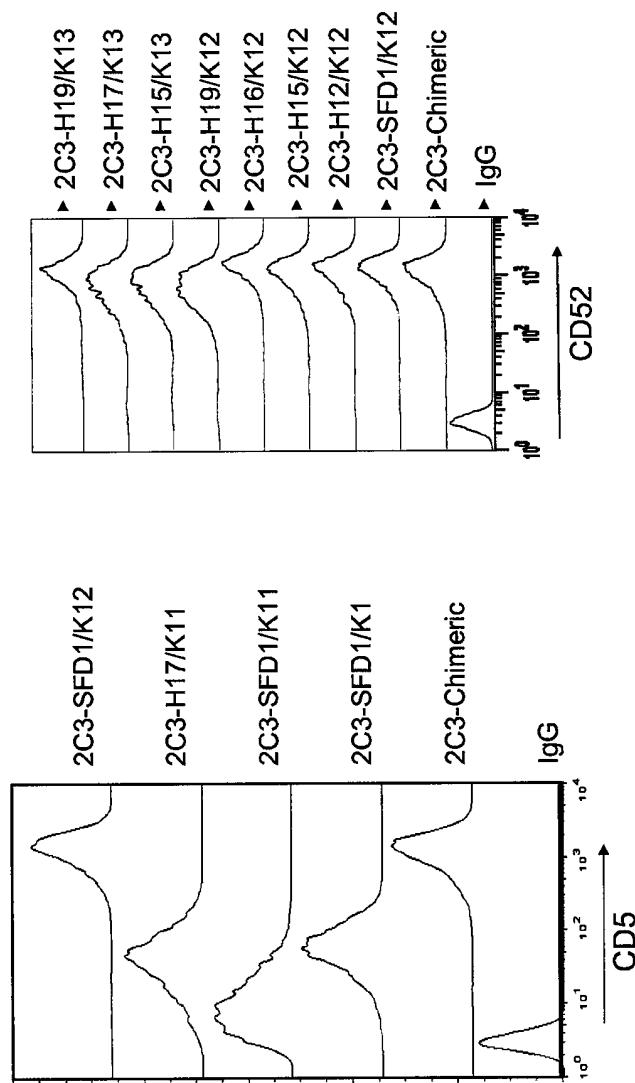


FIG. 27B

FIG. 27A

Humanized 12G6 clone heavy chain variable region sequences

12G6-SFD1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWRQAPGKGLEWVG**QIRLK**
SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 149)

12G6-VH 10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWRQAPGKGLEWVG**QIRLK**
SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSYLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 150)

12G6-VH 11

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWRQAPGKGLEWVA**QIRLK**
SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSYLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 151)

12G6-VH12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWRQAPGKGLEWVA**QIRLK**
SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSYLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 152)

FIG. 28A

Humanized 12G6 clone light (kappa) chain variable region sequence

12G6-VK1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQLIY
LVSKLDGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQQGT
LEIK (SEQ ID NO: 153)

12G6-VK10

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWVLQKPGQSPQLIY
LVSKLDGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQQGT
LEIK (SEQ ID NO: 154)

12G6-VK11

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWVLQKPGQSPKRLIY
LVSKLDGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQQGT
LEIK (SEQ ID NO: 155)

12G6-VK12

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWVLQKPGQSPQRRLIY
LVSKLDGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQQGT
LEIK (SEQ ID NO: 156)

12G6-VK13

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQRRLIY
LVSKLDGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQQGT
LEIK (SEQ ID NO: 157)

FIG. 28B

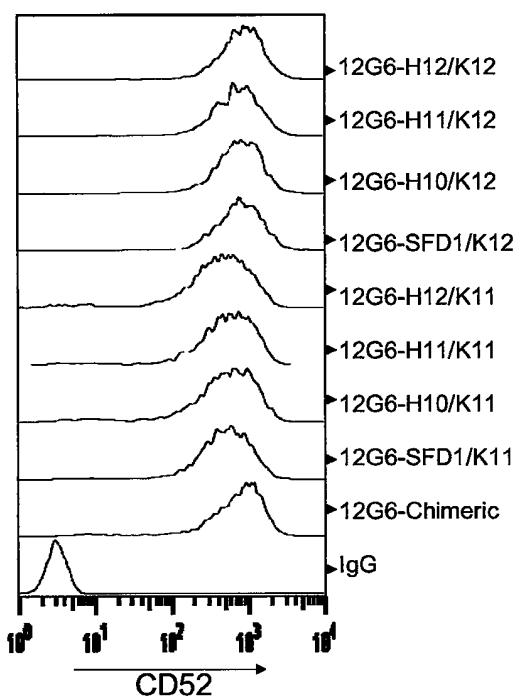


FIG. 29

Humanized 9D9 clone heavy chain variable region sequences

9D9-VH10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVSEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLDSWGQGT
TVSS (SEQ ID NO: 158)

9D9-VH11

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLETAEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNSKTYYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLDSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 159)

9D9-VH15

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLETAEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLDSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 160)

9D9-VH 16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEVSEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLDSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 161)

9D9-VH 17

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLETSEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLDSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 162)

9D9-VH 18

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEVAEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLDSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 163)

FIG. 30A

Humanized 9D9 clone light (kappa) chain variable region sequences

9D9-VK2

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYL
VSALDSGVPDFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 164)

9D9-VK12

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNWLQKPGQSPKRLIYL
VSALDSGVPDFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 165)

9D9-VK13

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNWLQKPGQSPQRRLIYL
VSALDSGVPDFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 166)

9D9-VK14

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNWYLQKPGQSPQRRLIYL
VSALDSGVPDFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 167)

9D9-VK15

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNWYLQKPGQSPKRLIYL
VSALDSGVPDFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 168)

FIG. 30B

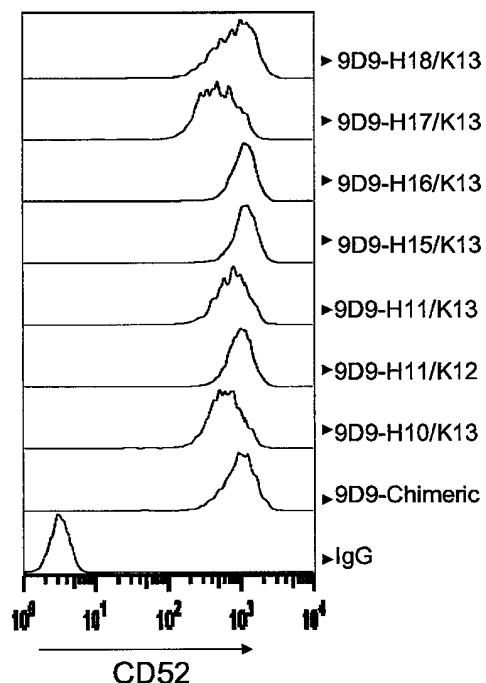


FIG. 31

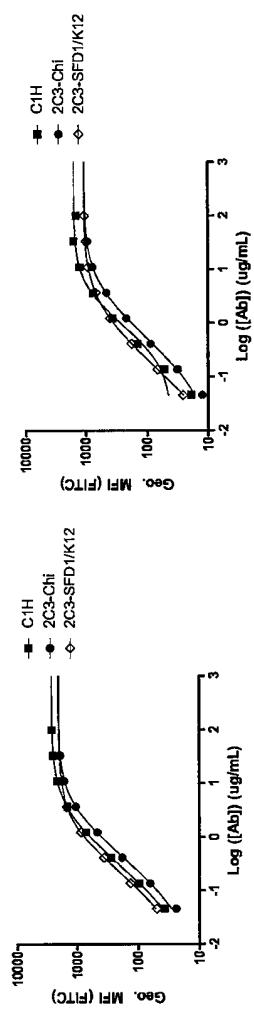
Human CD4+ T cells**hCD52 Tg mouse CD4+ T**

FIG. 32A

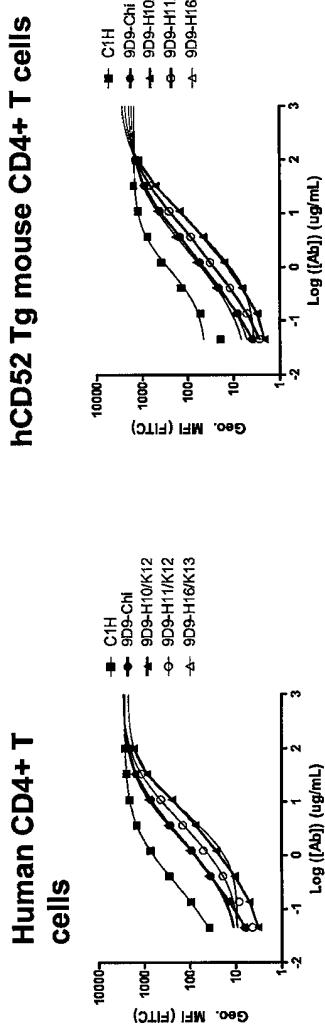


FIG. 32B

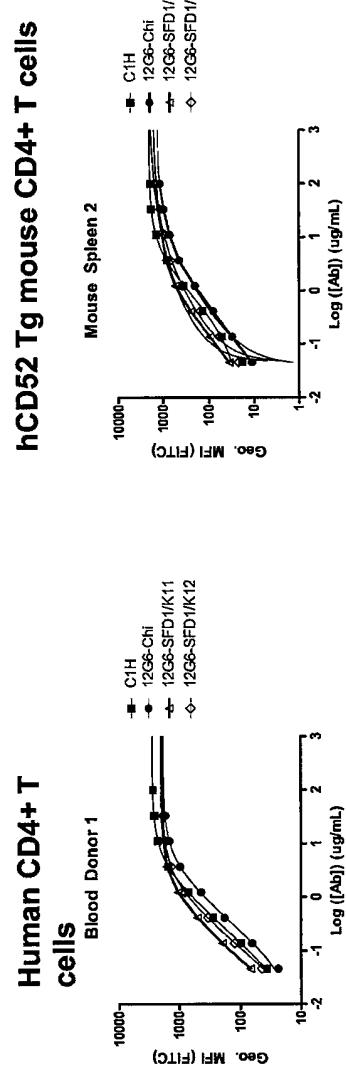


FIG. 32C

	EC₅₀ (nM)	
	Human CD4+ T cells	huCD52 transgenic mouse CD4+ T cells
Campath-1H®	21.91	25.08
2C3-Chimeric	25.93	30.81
2C3-SFD1/K12	11.00	13.61
12G6-Chimeric	22.41	34.42
12G6-SFD1/K11	7.30	13.17
12G6-SFD1/K12	10.58	

FIG. 33

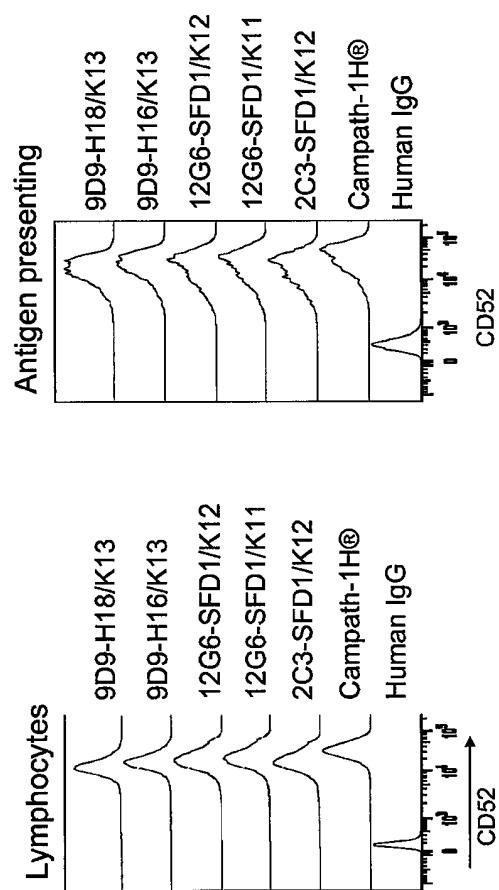


FIG. 34

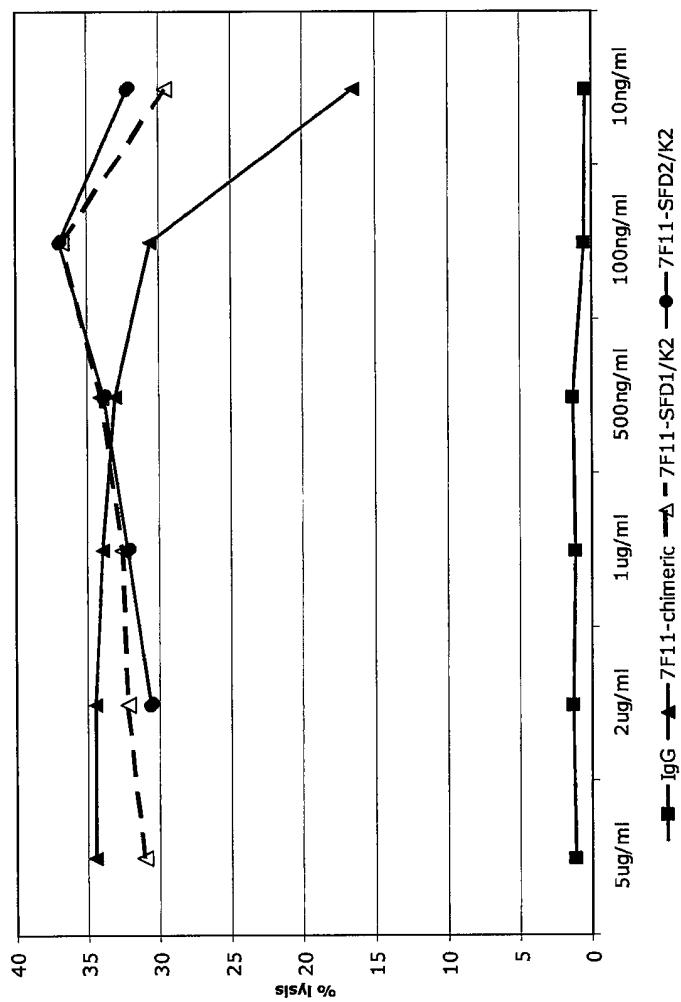


FIG. 35

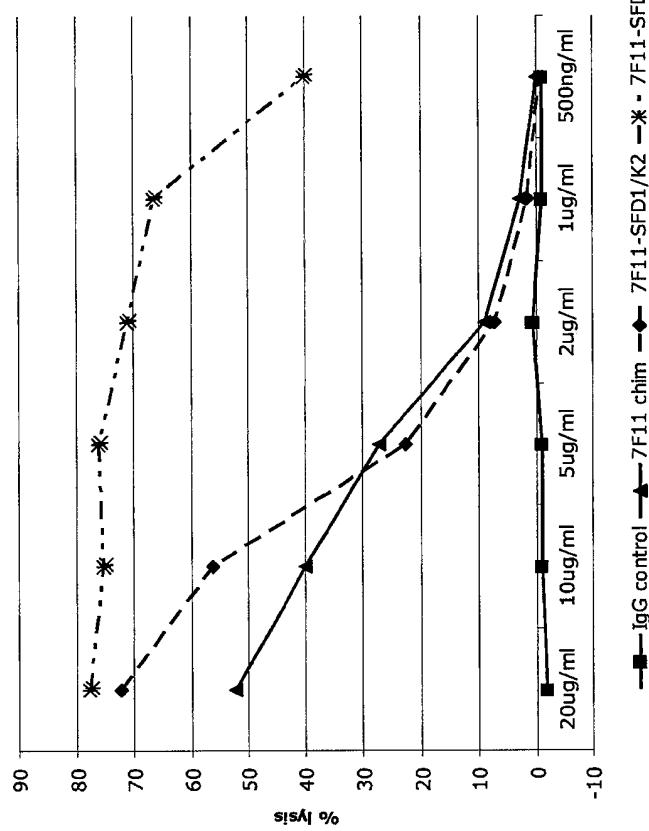


FIG. 36

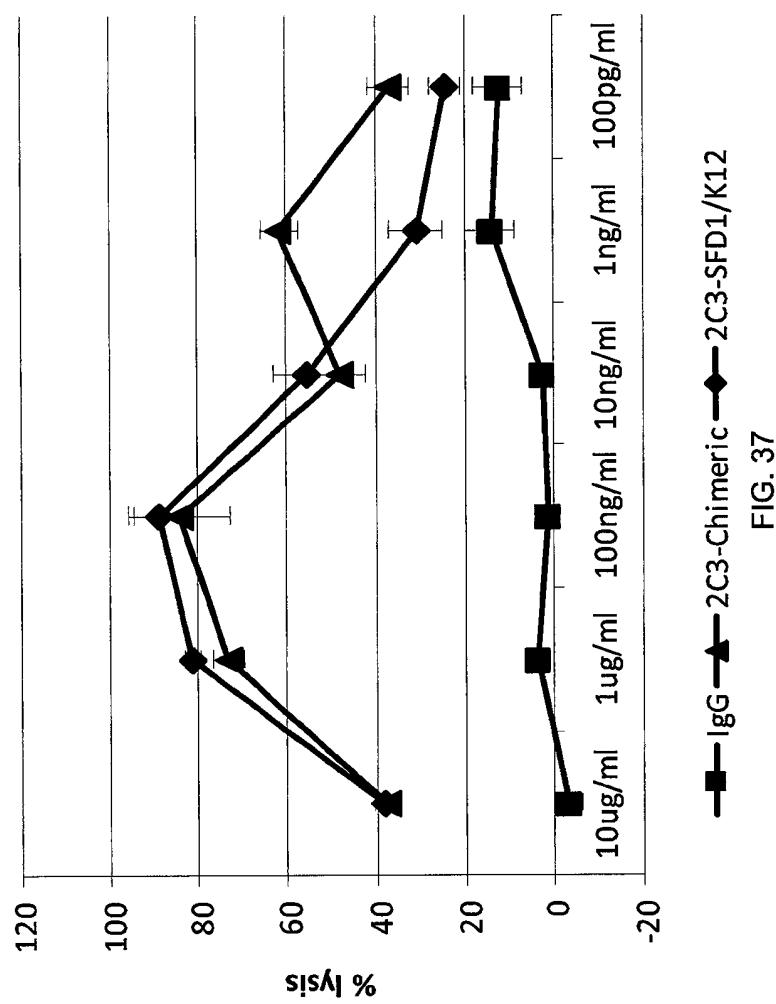


FIG. 37

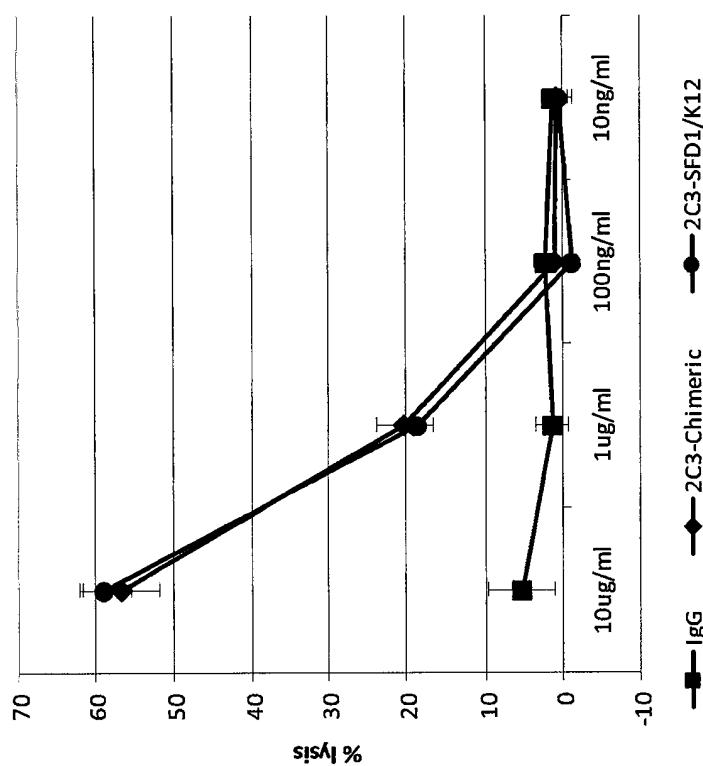


FIG. 38

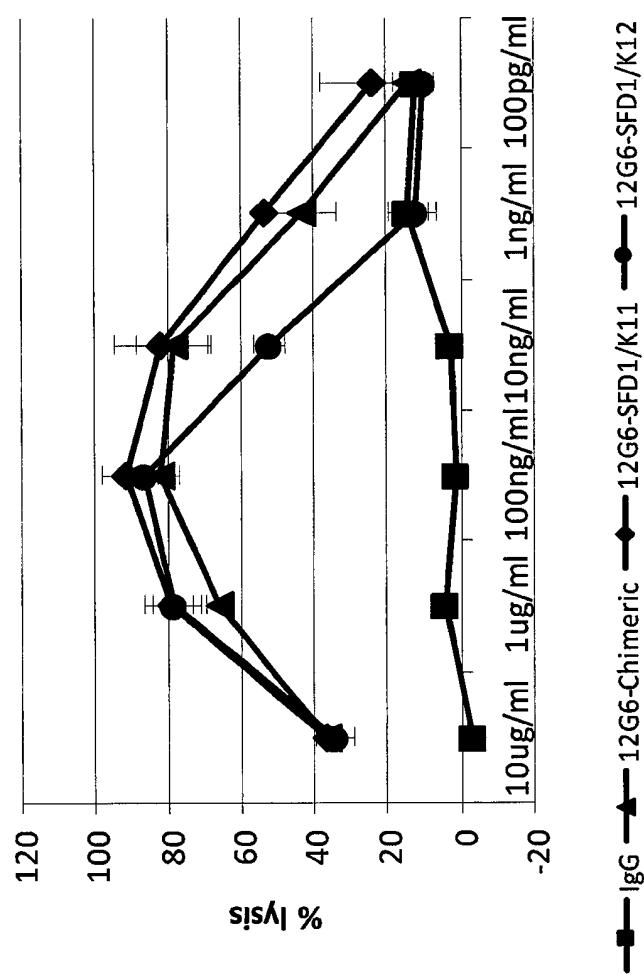


FIG. 39

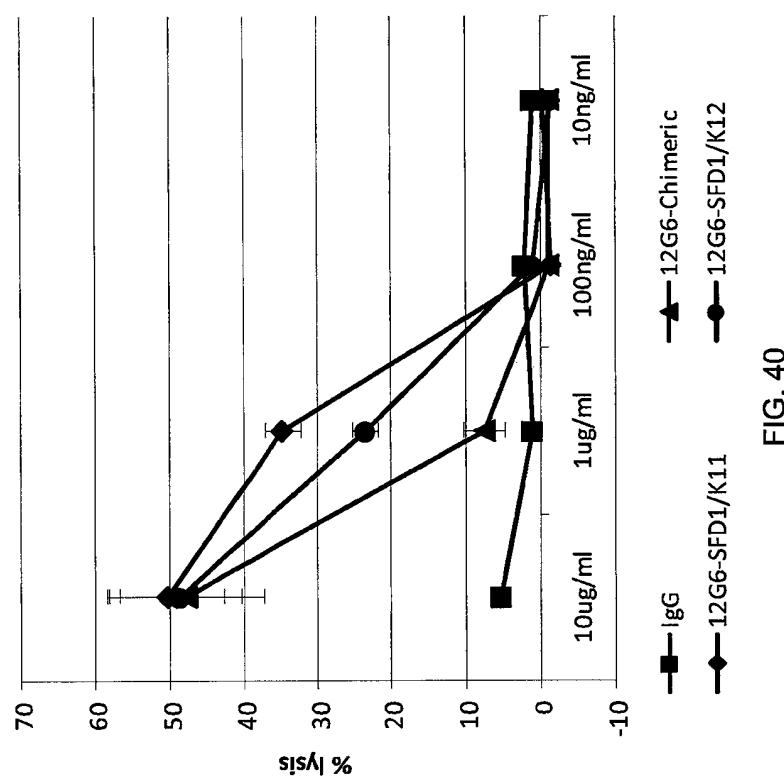


FIG. 40

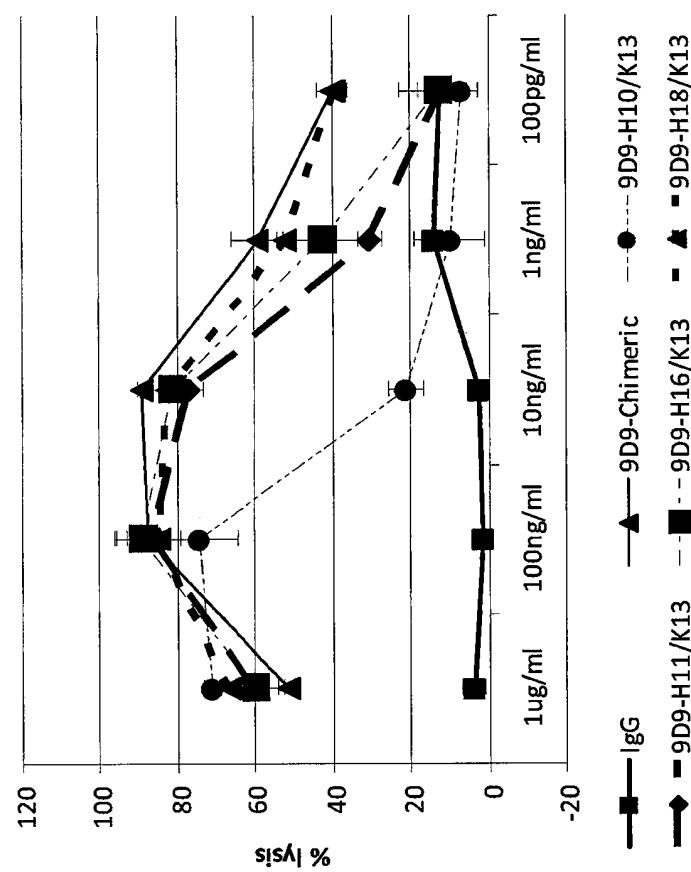


FIG. 41

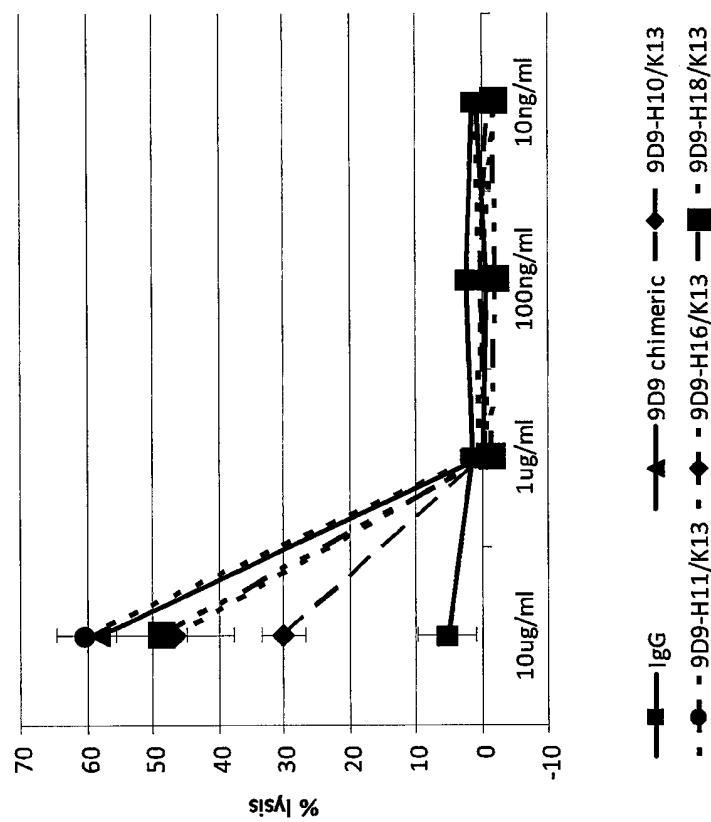


FIG. 42

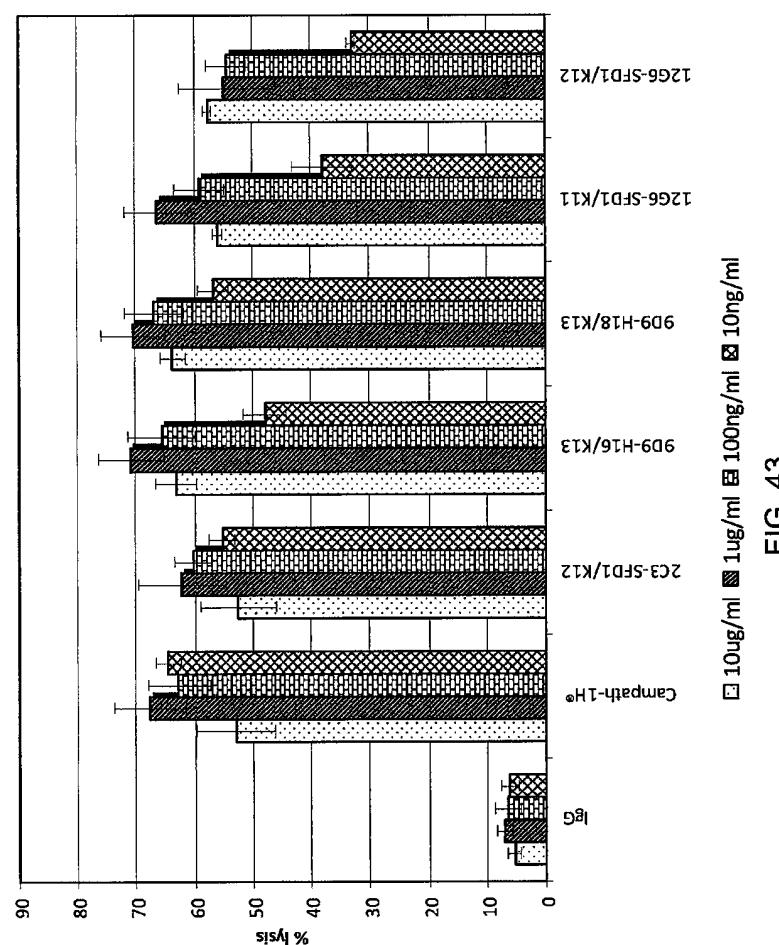


FIG. 43

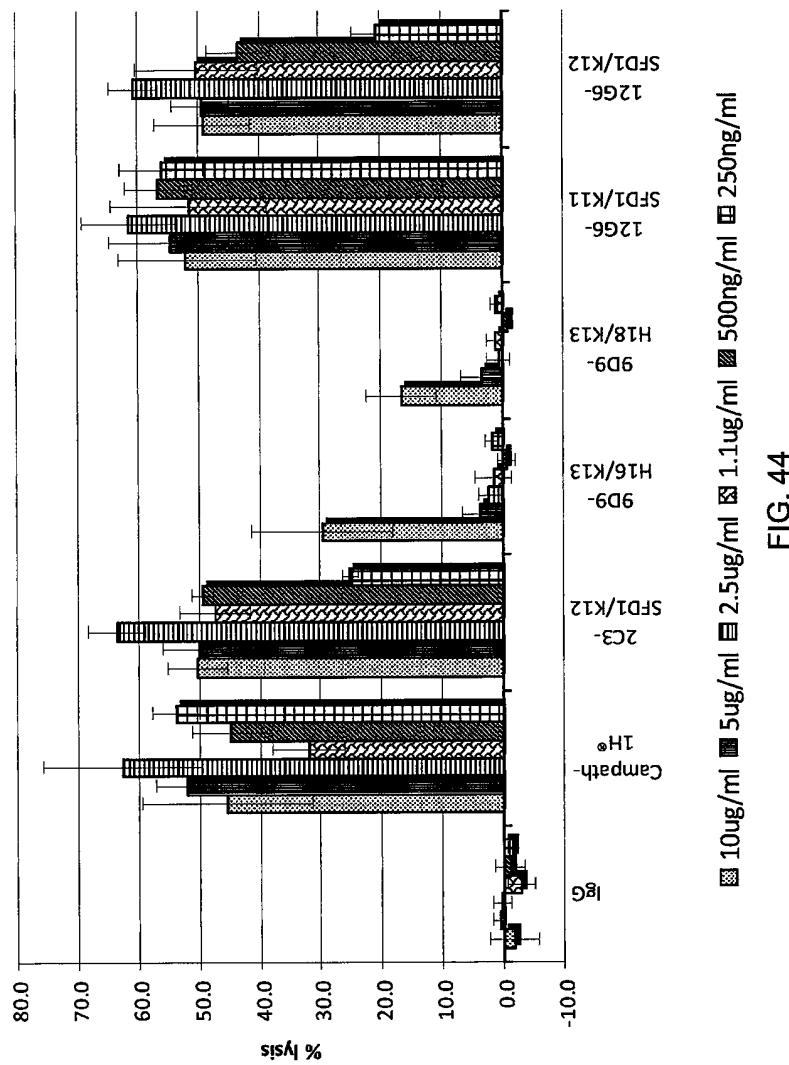


FIG. 44

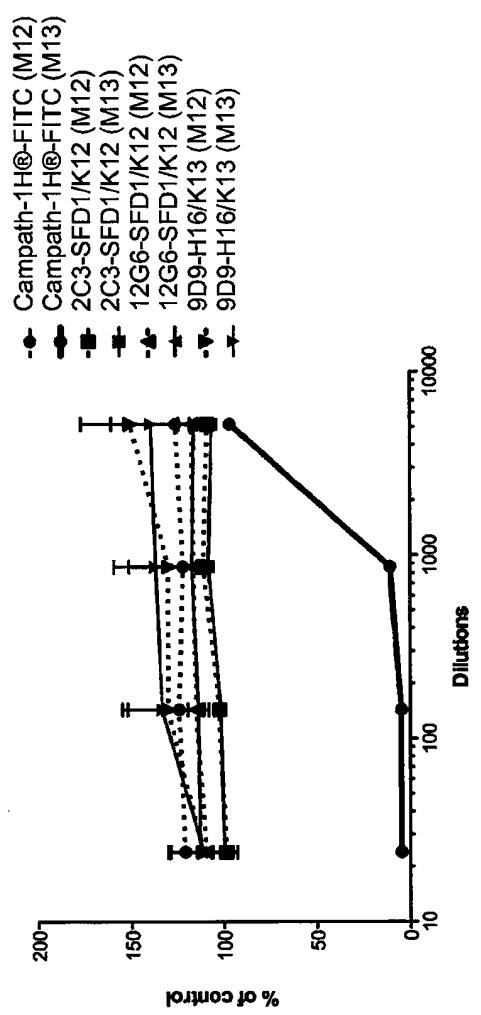


FIG. 45

FIG. 46A

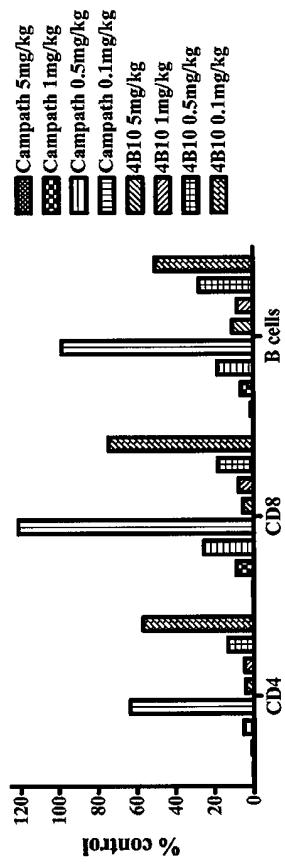
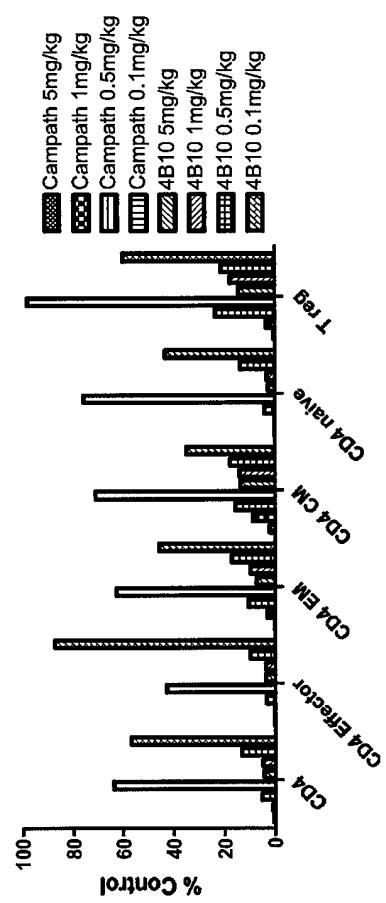
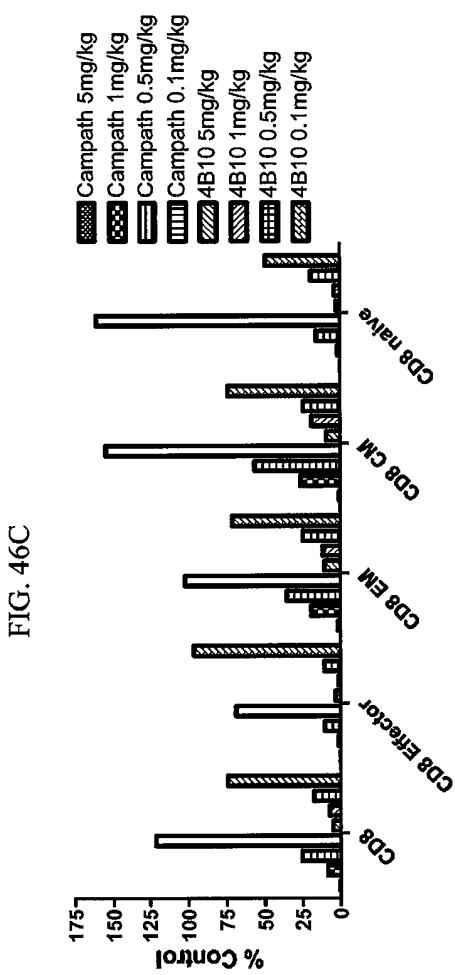


FIG. 46B





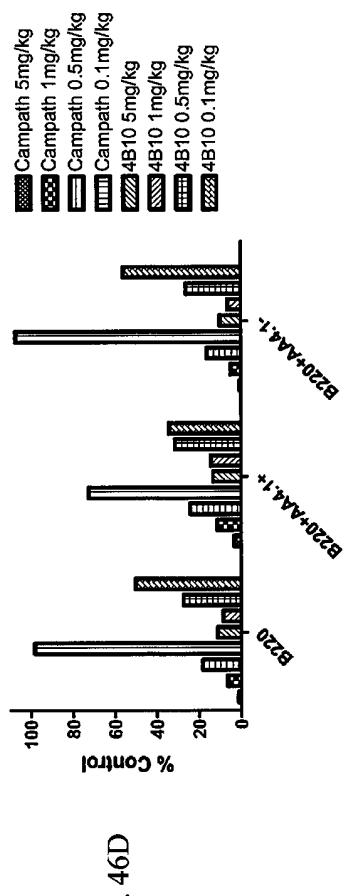


FIG. 46D

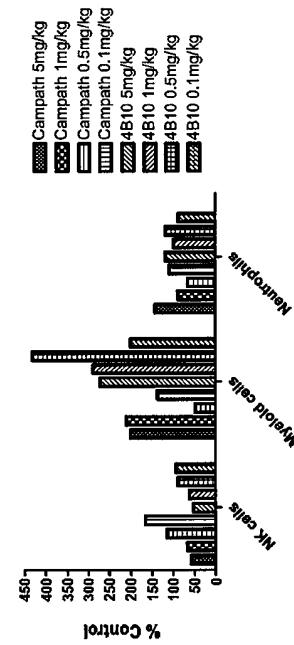


FIG. 46E

FIG. 47A

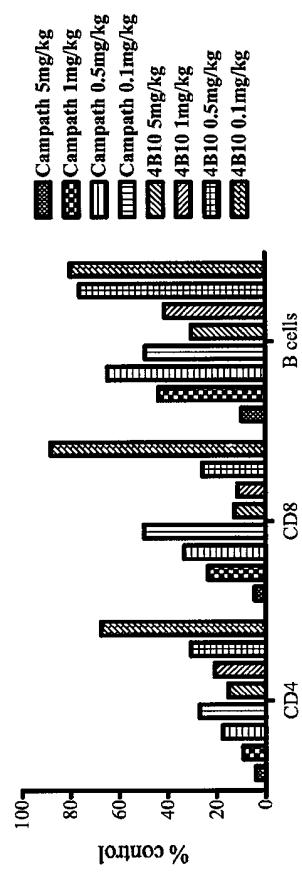
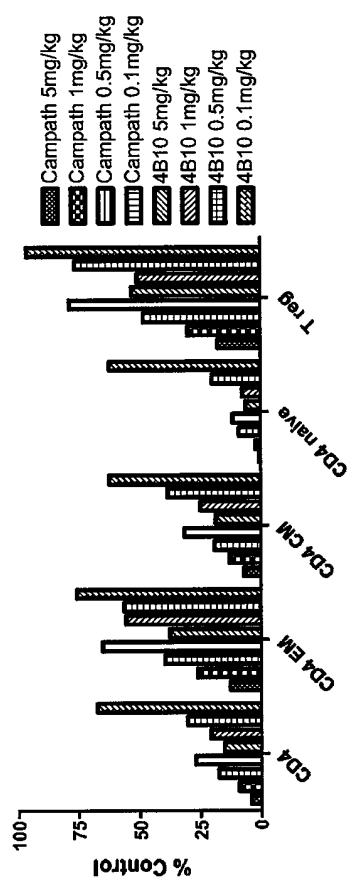
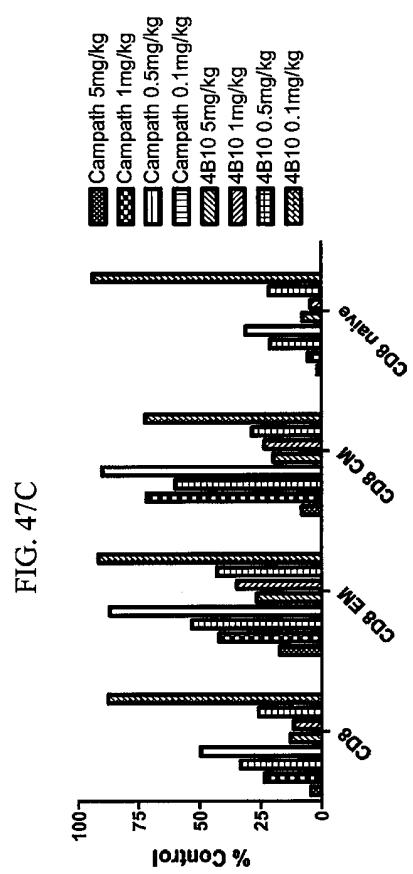
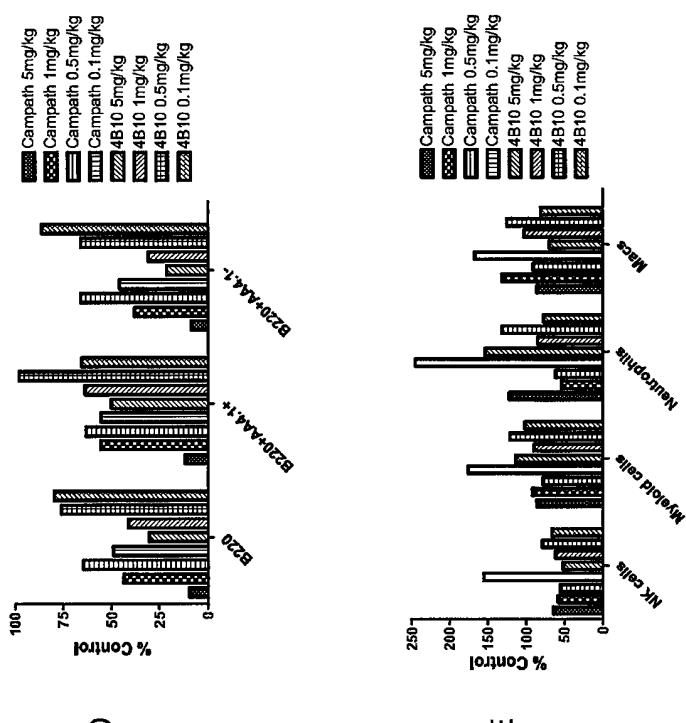


FIG. 47B







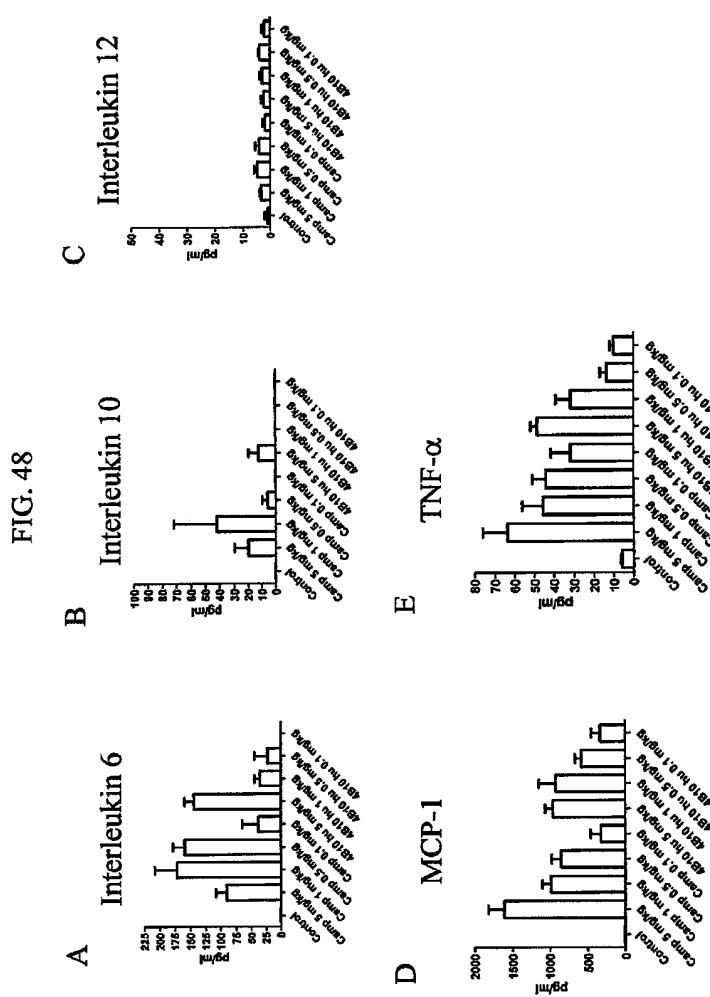


FIG. 49

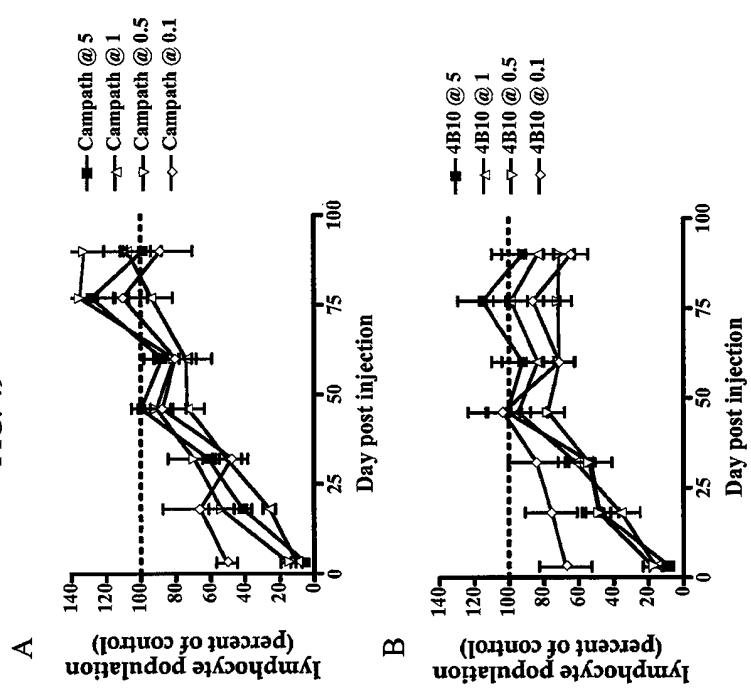


FIG. 50A

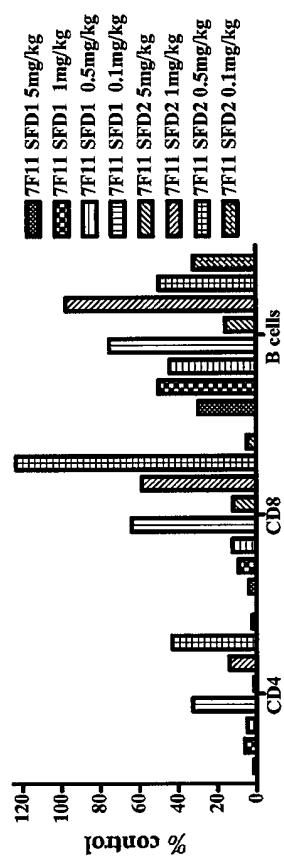


FIG. 50B

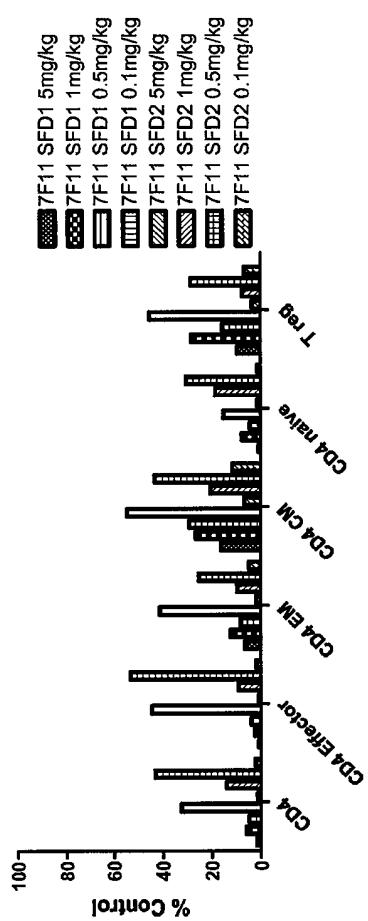
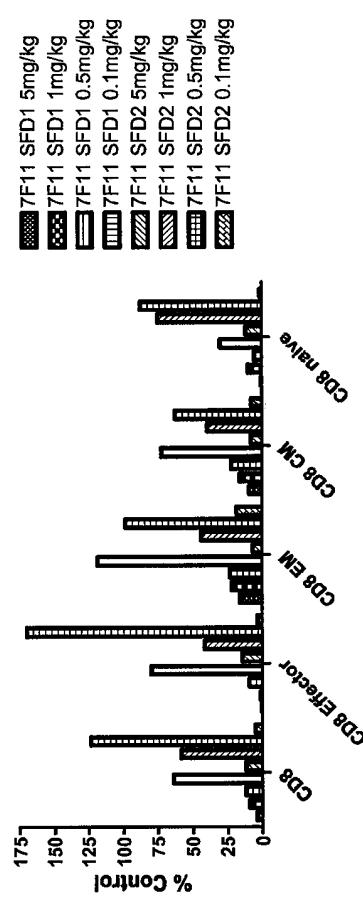


FIG. 50C



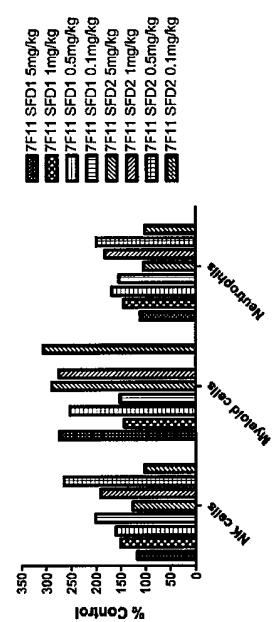
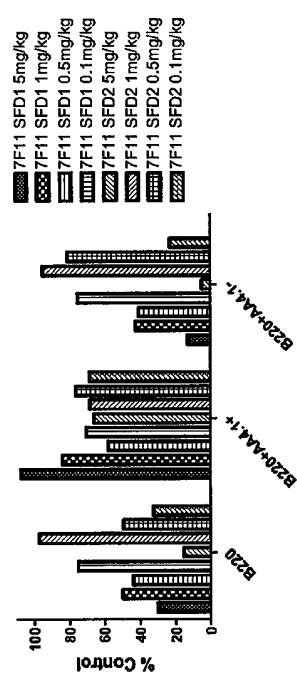


FIG. 51A

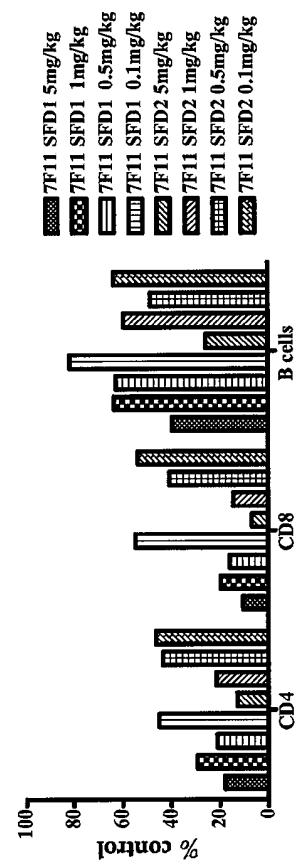


FIG. S1B

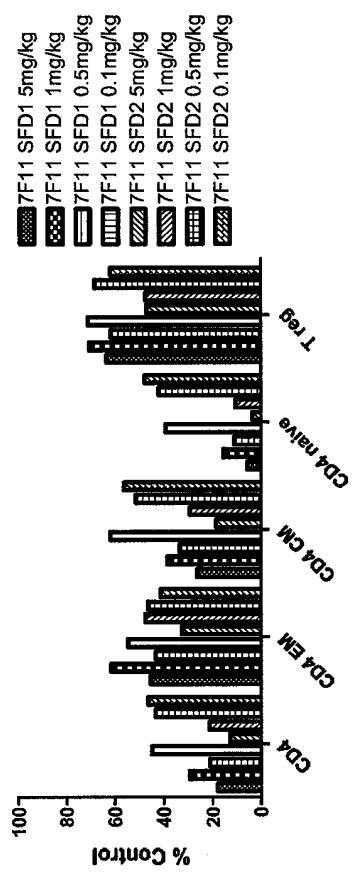
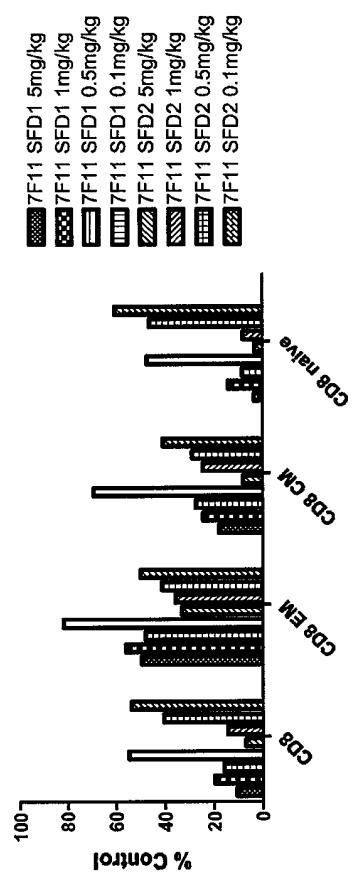


FIG. 51C



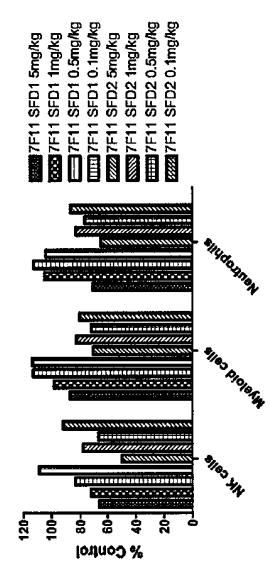
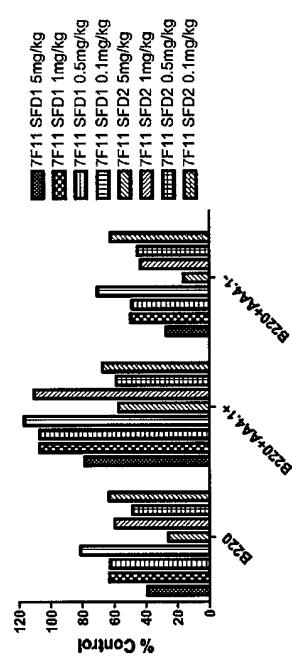


FIG. 52

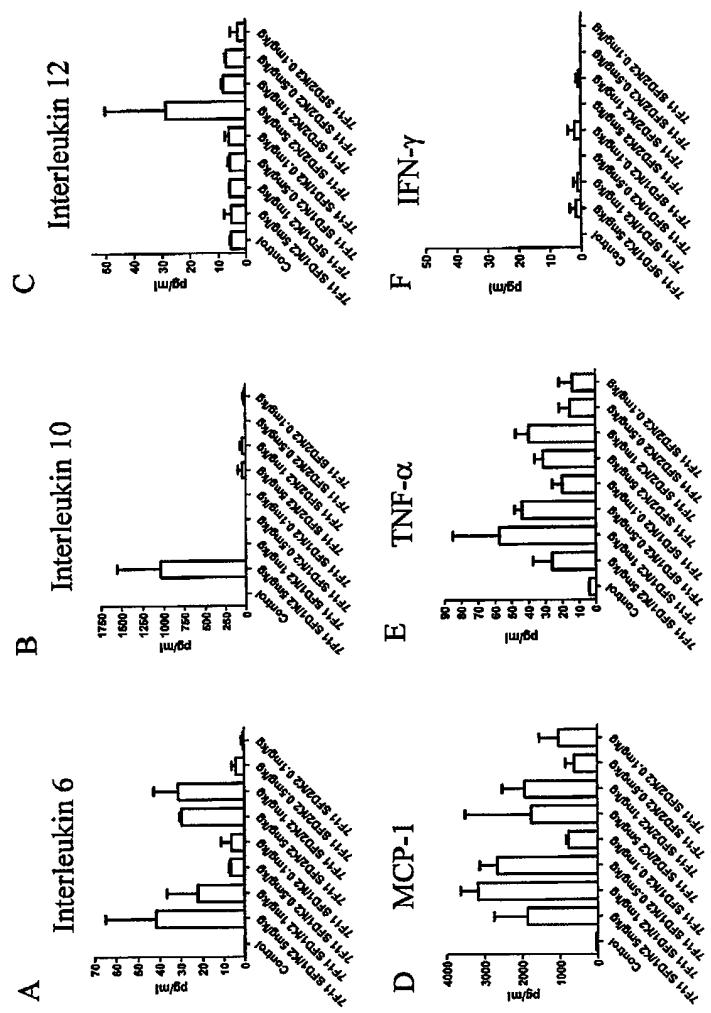


FIG. 53

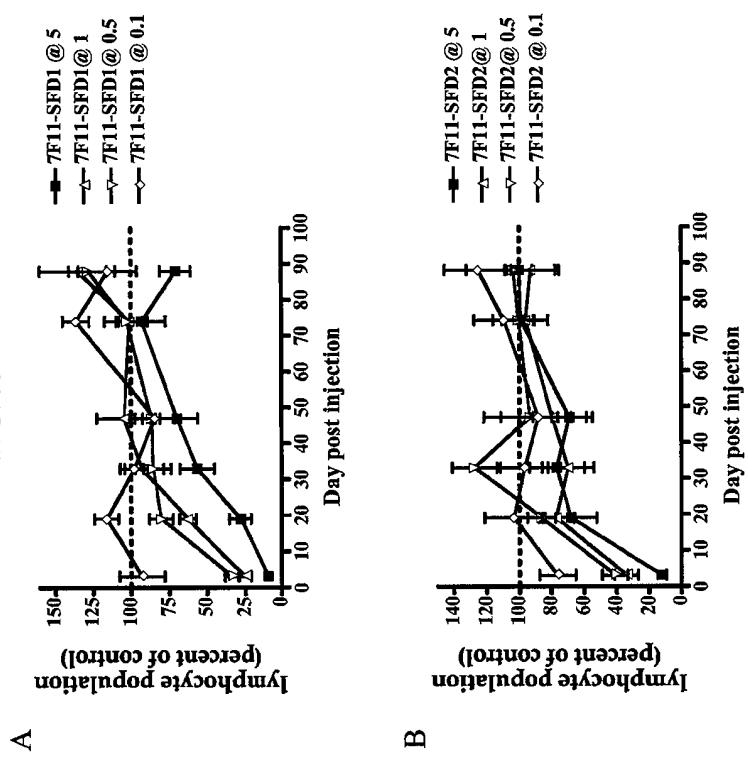


FIG. 54

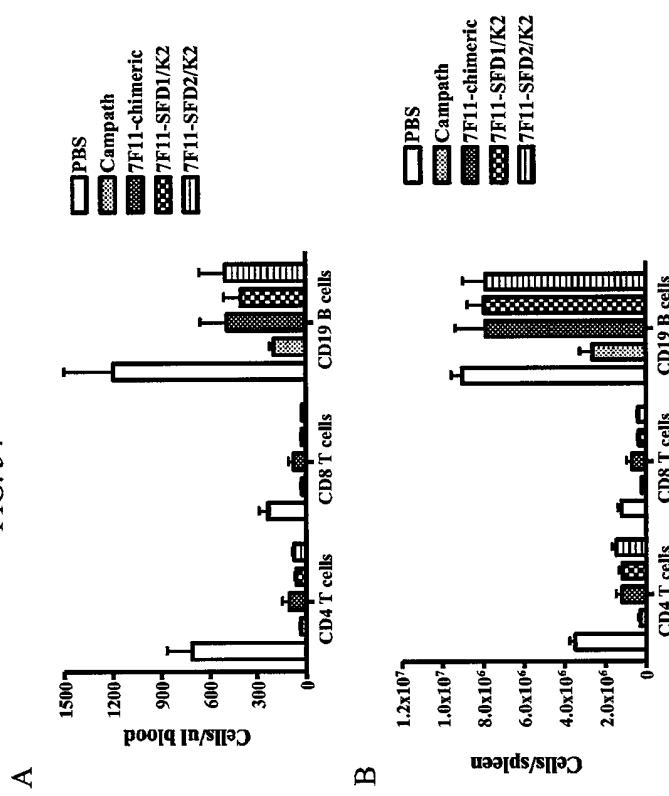


FIG. 55

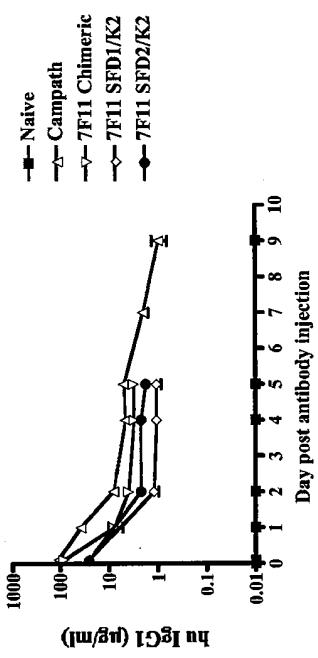


FIG. 56A

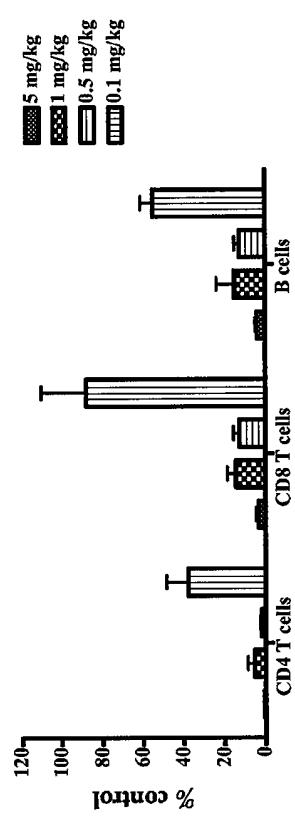


FIG. 56B

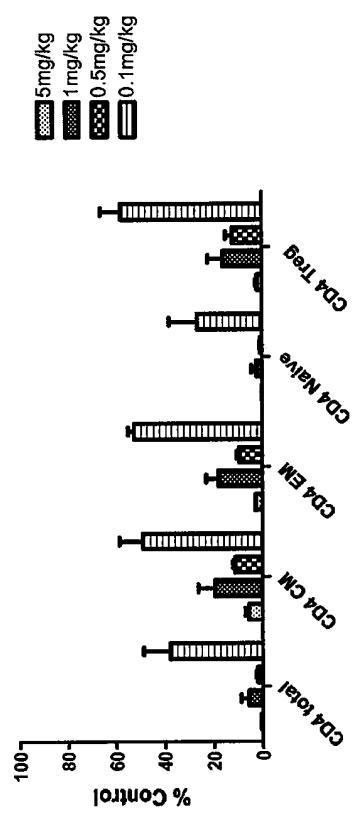
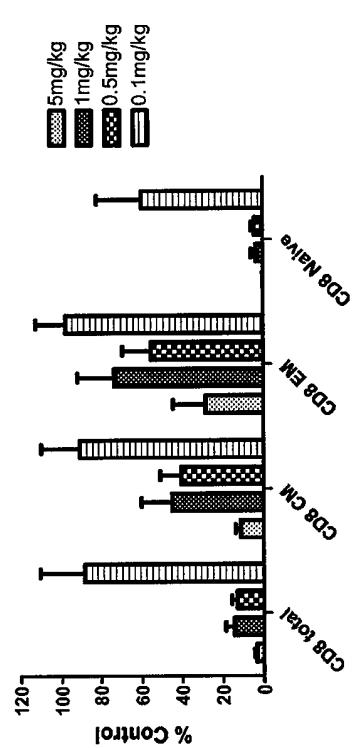


FIG. 56C



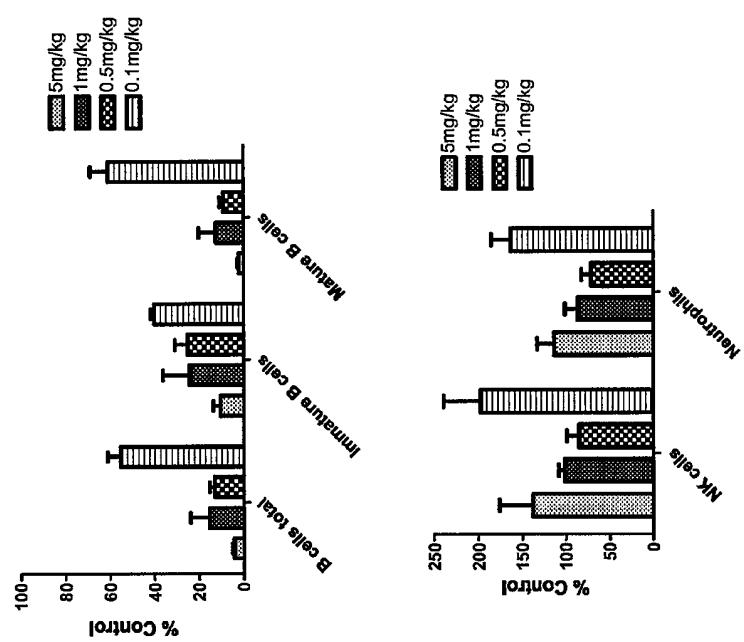
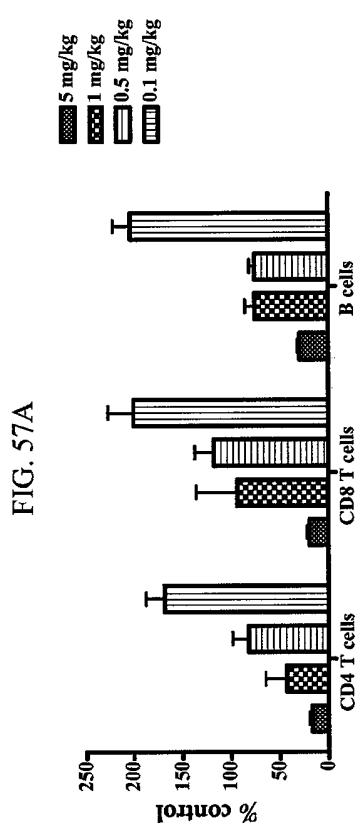


FIG. 56D

FIG. 56E



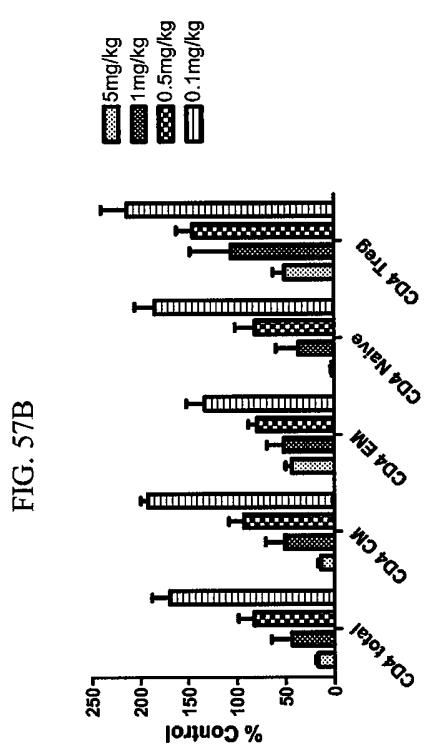
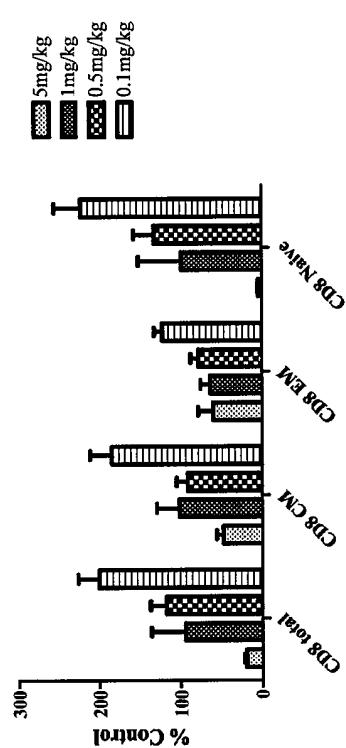
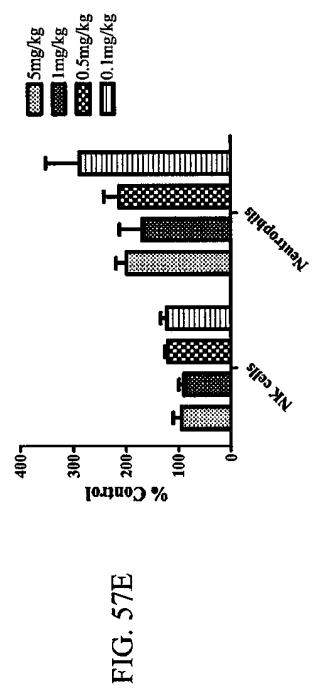
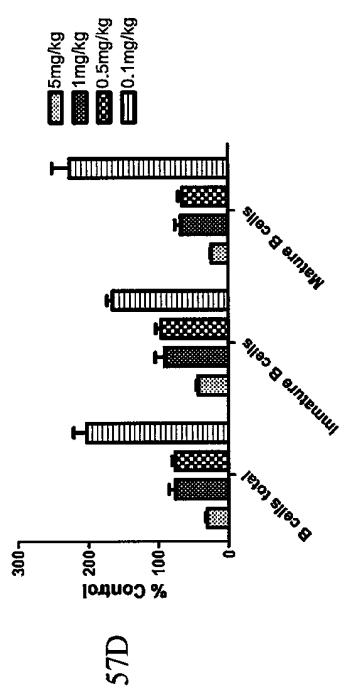


FIG. 57C





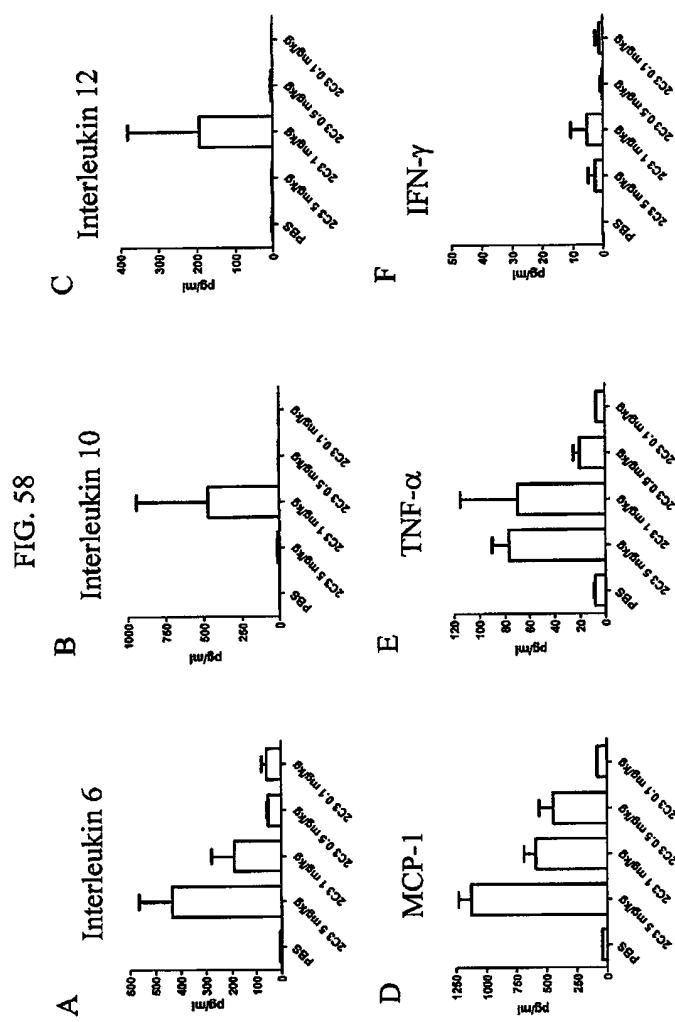


FIG. 59

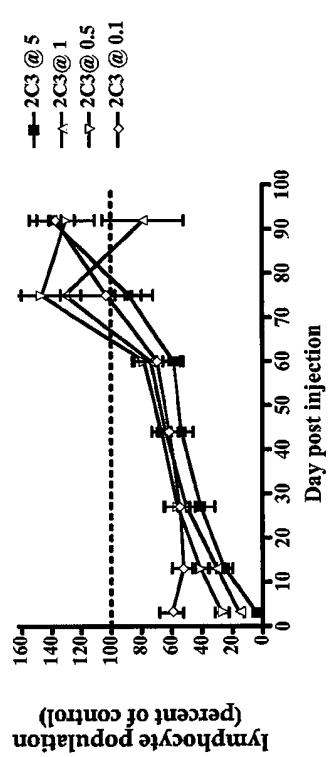
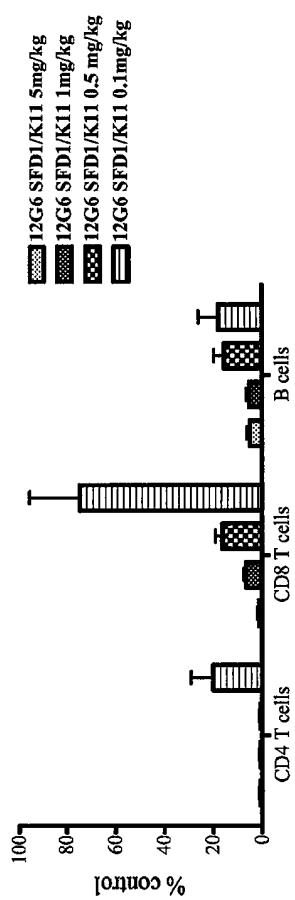


FIG. 60A



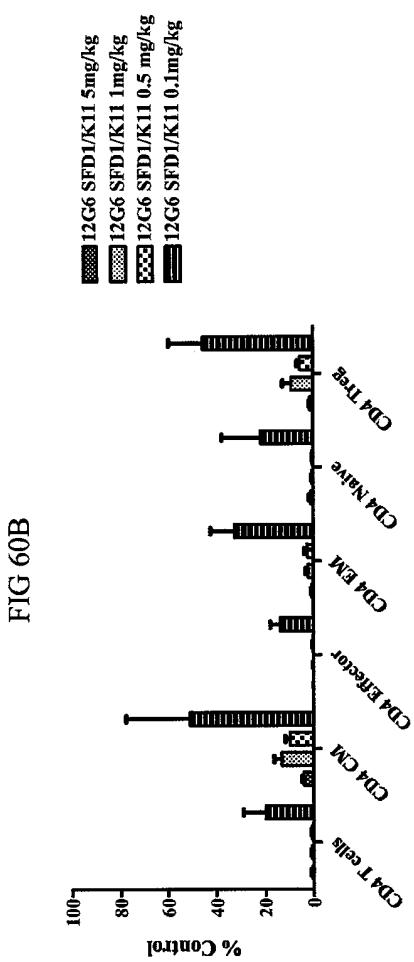
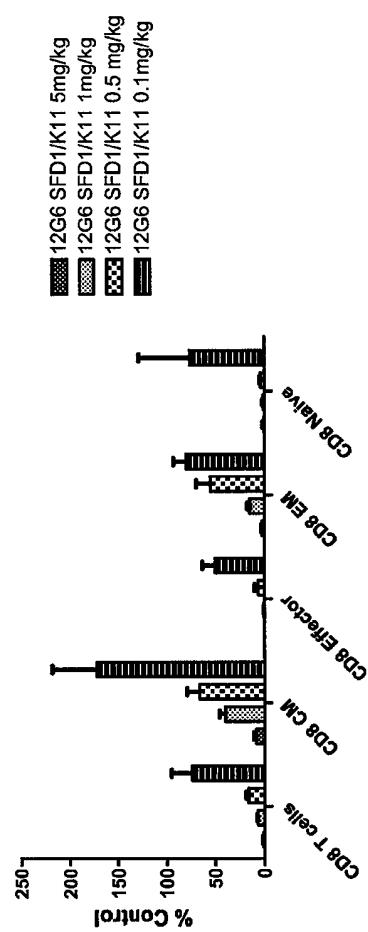


FIG. 60C



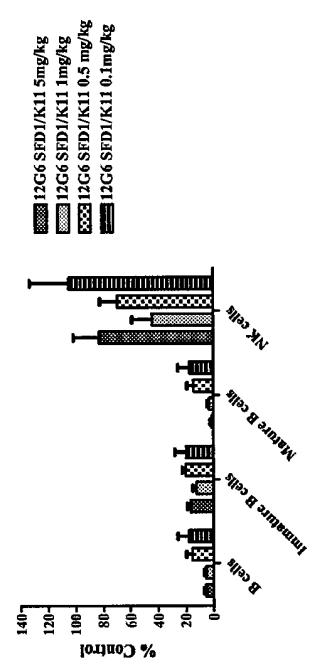


FIG. 60D

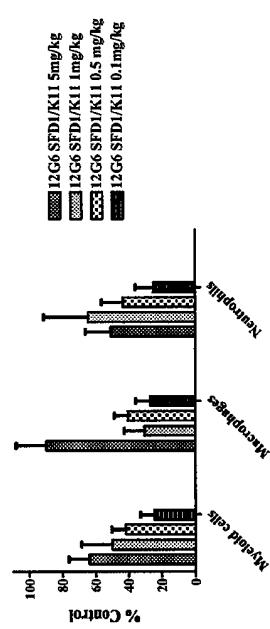


FIG. 60E

FIG. 61A

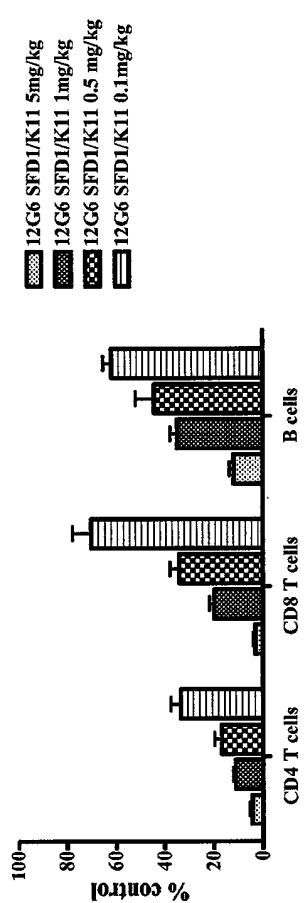


FIG. 6B

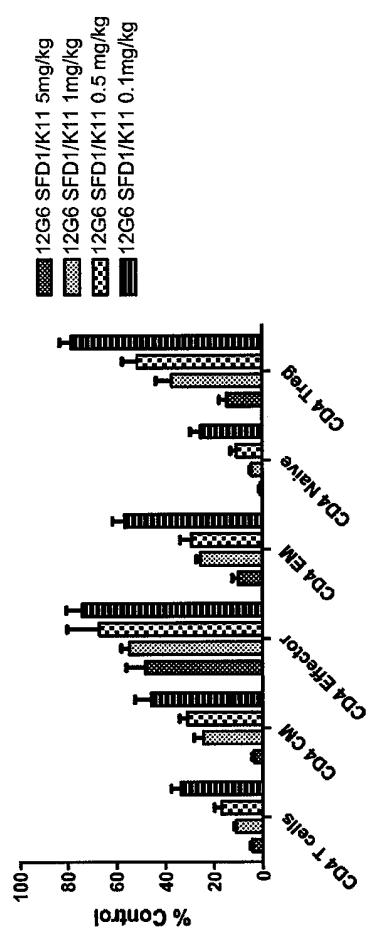
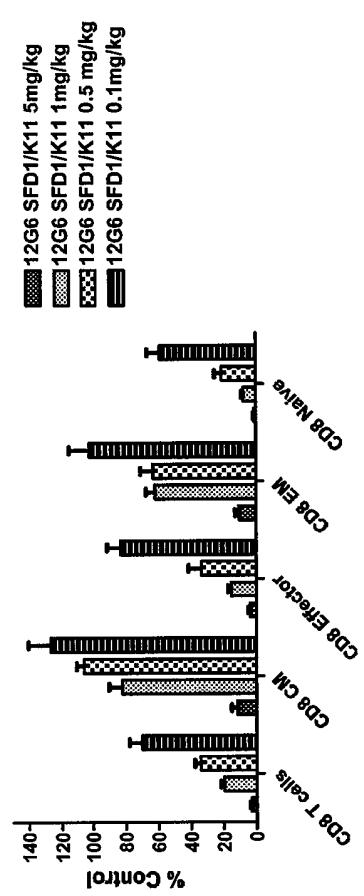
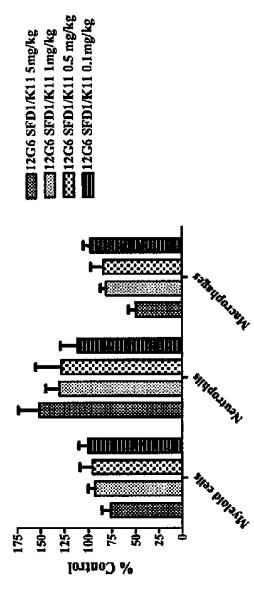
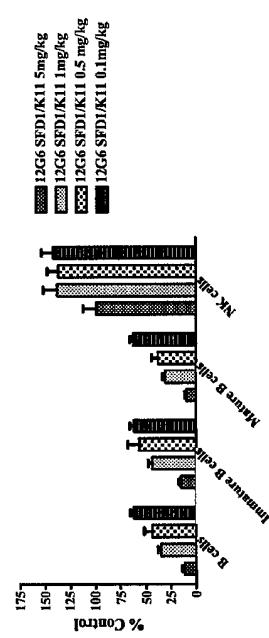


FIG. 61C





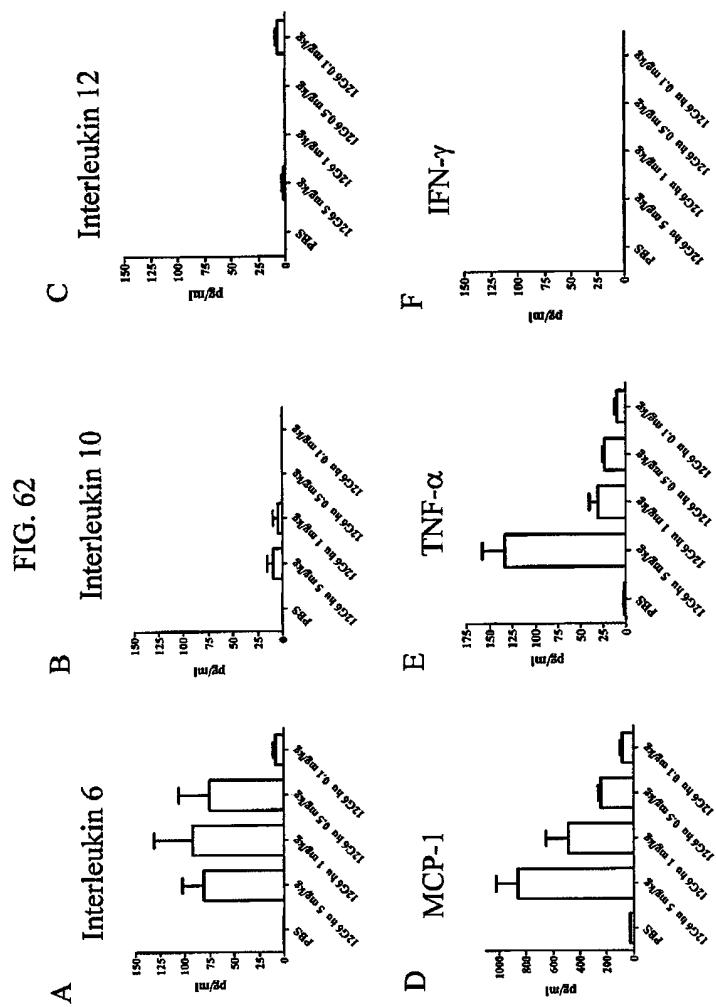


FIG. 63

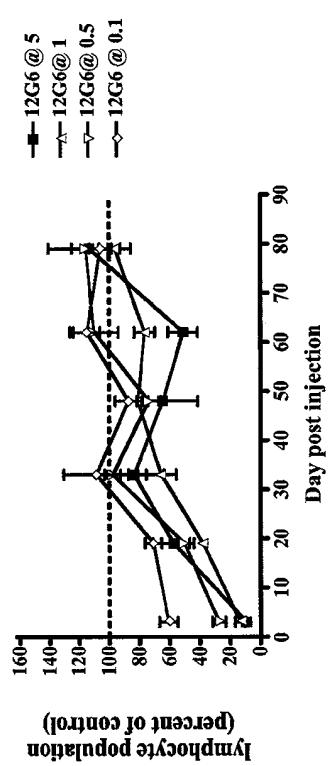


FIG. 64

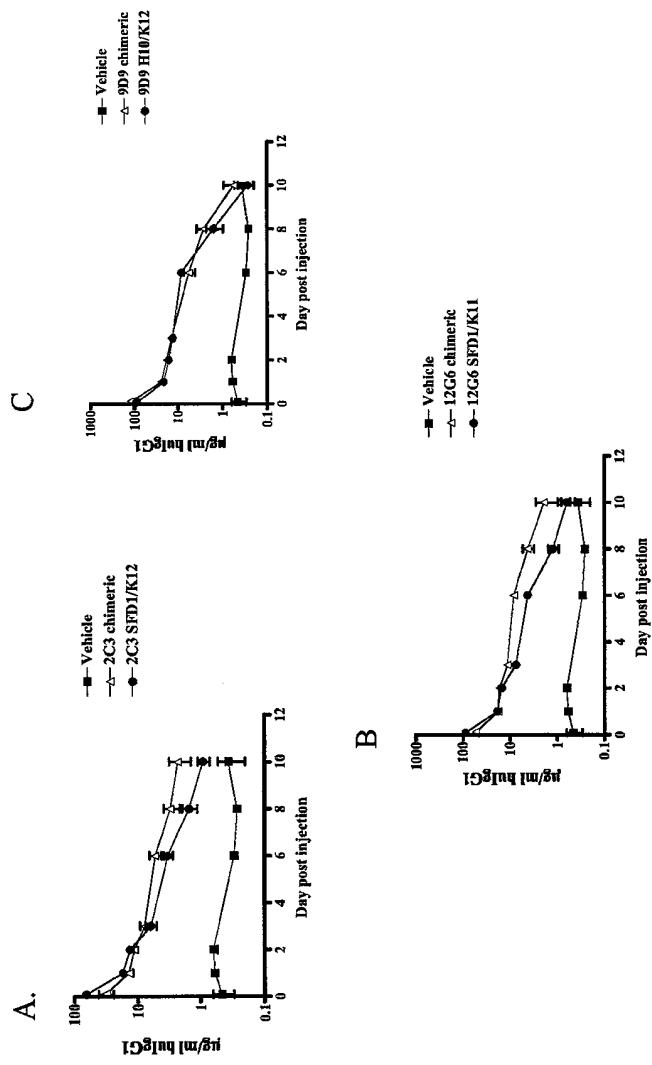
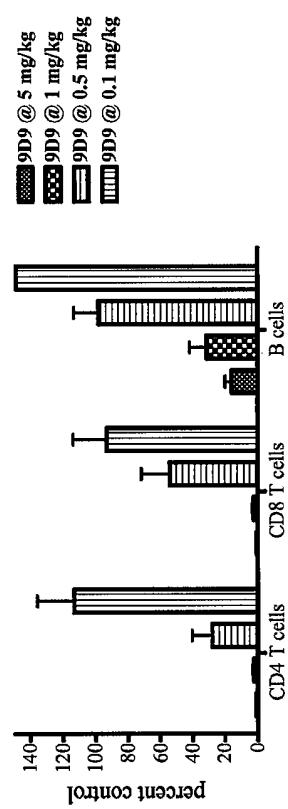
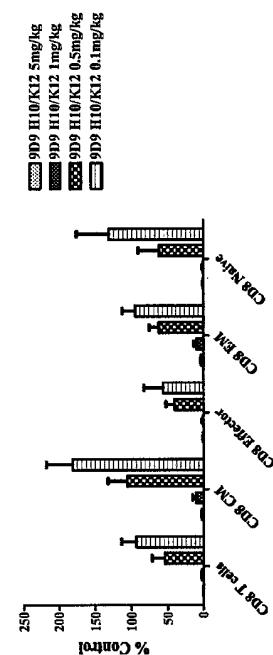
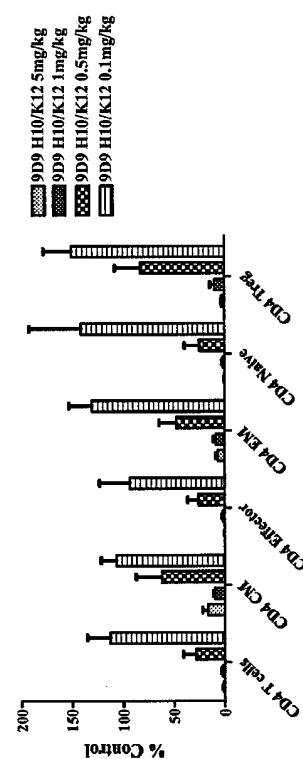
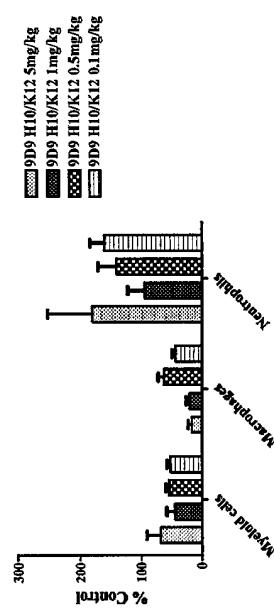
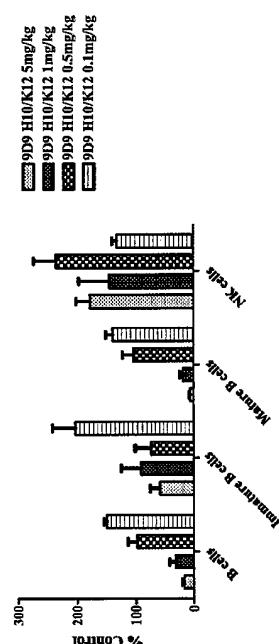
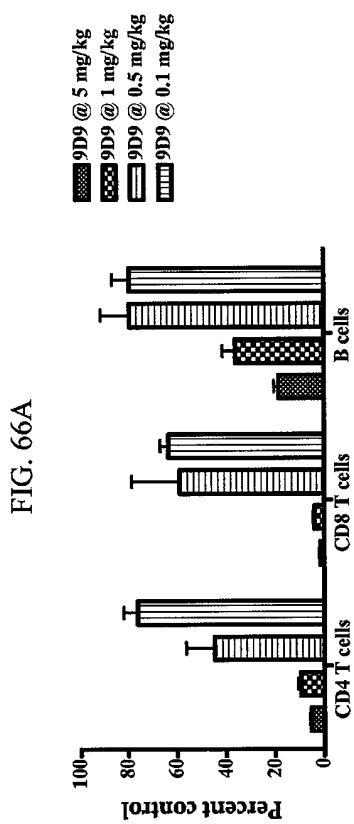


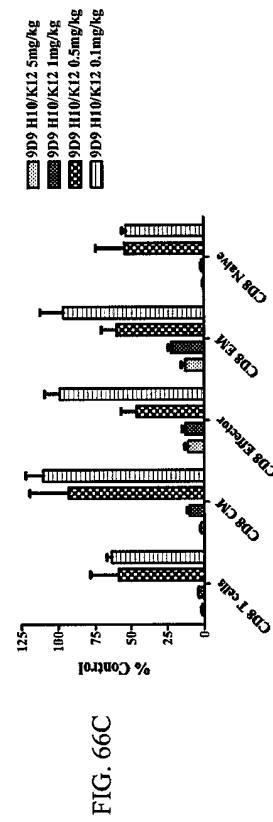
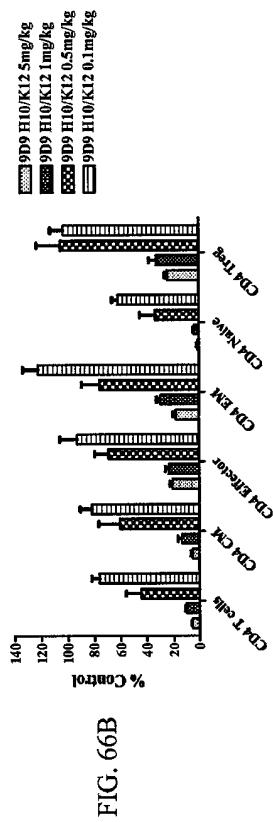
FIG. 65A

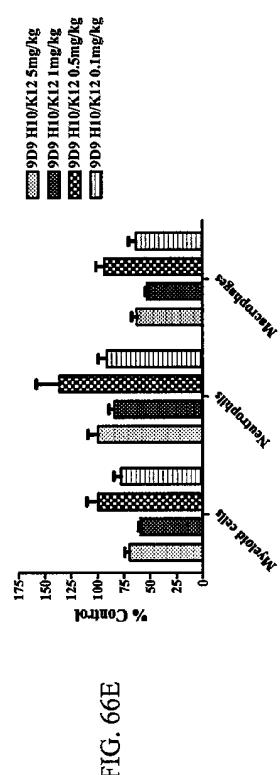
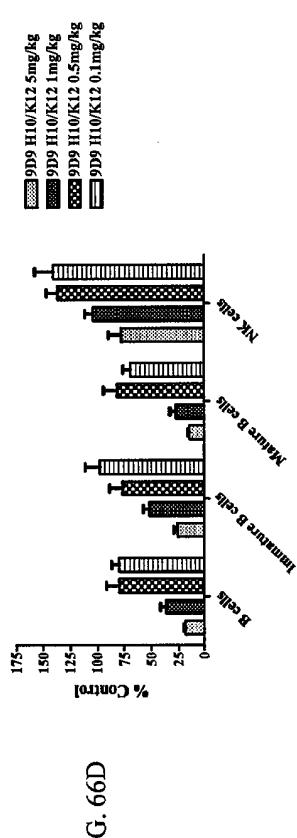












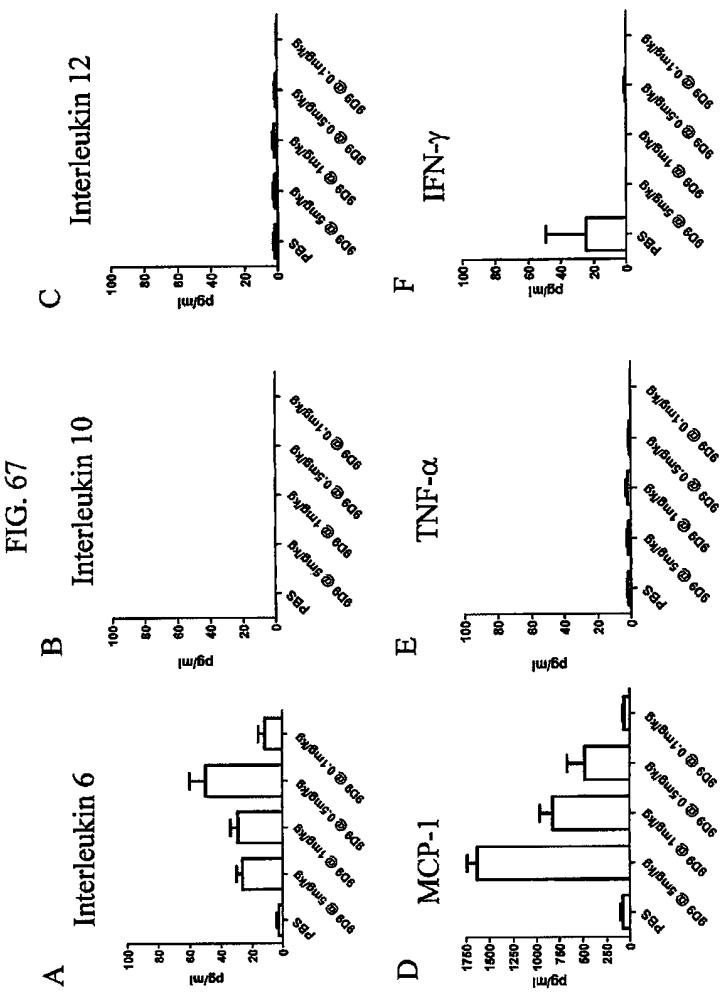


FIG. 68

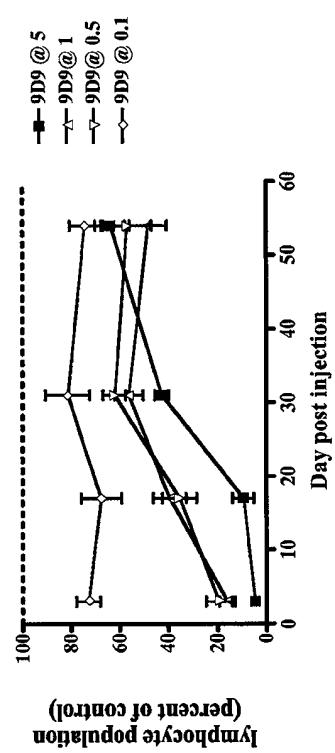
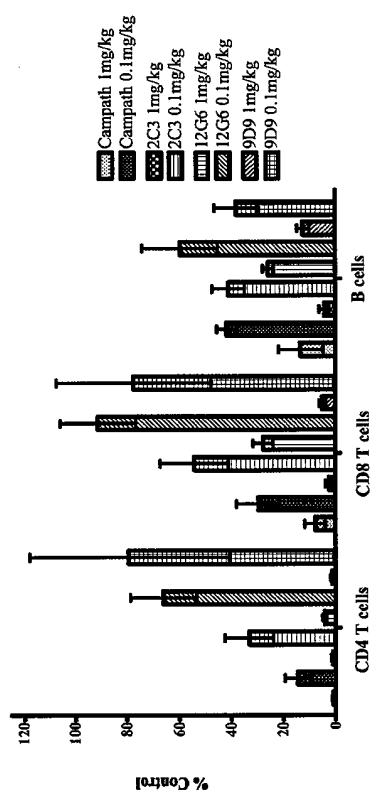


FIG. 69A



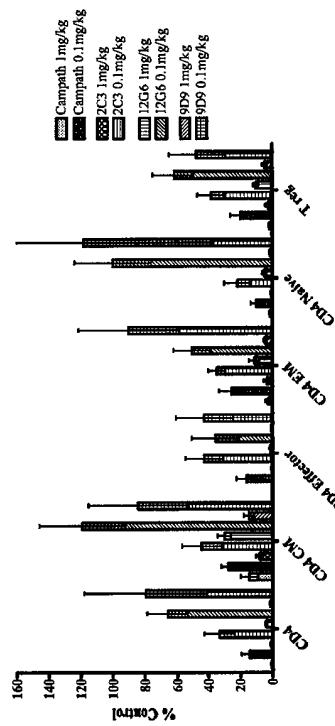


FIG. 69B

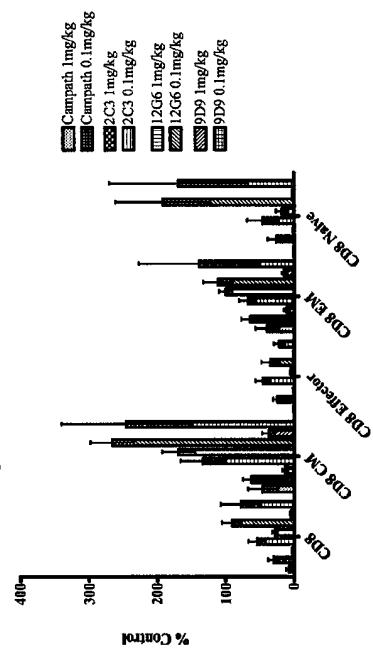


FIG. 69C

FIG. 69D

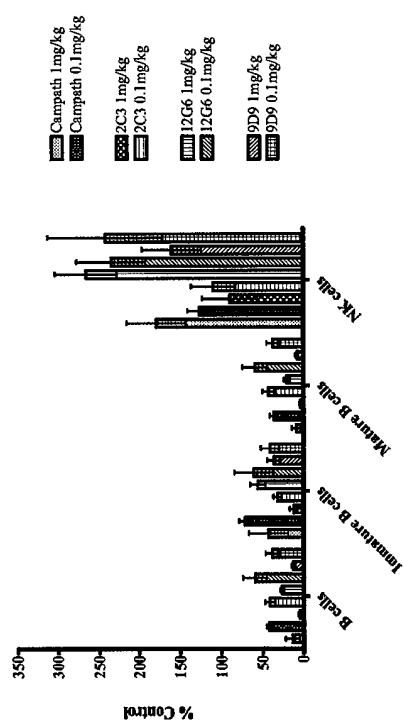
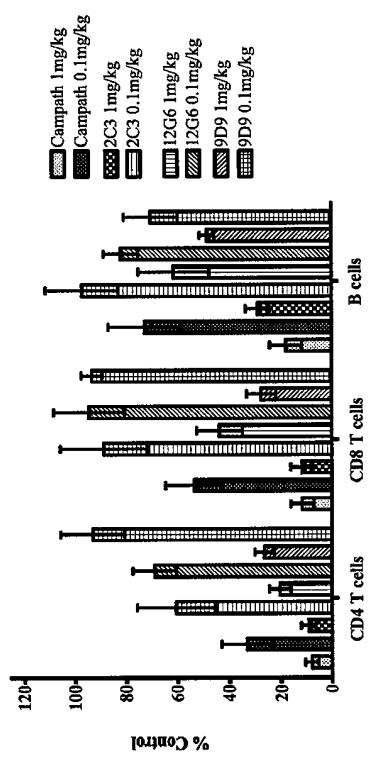


FIG. 70A



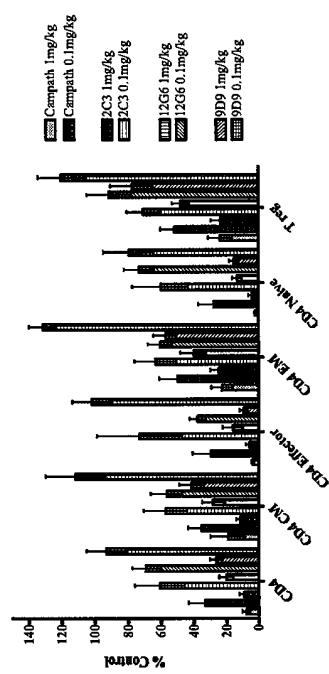


FIG. 70B

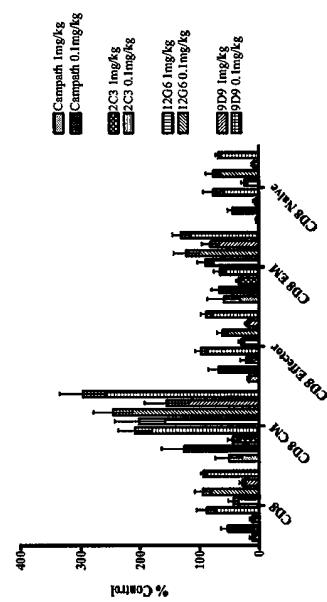
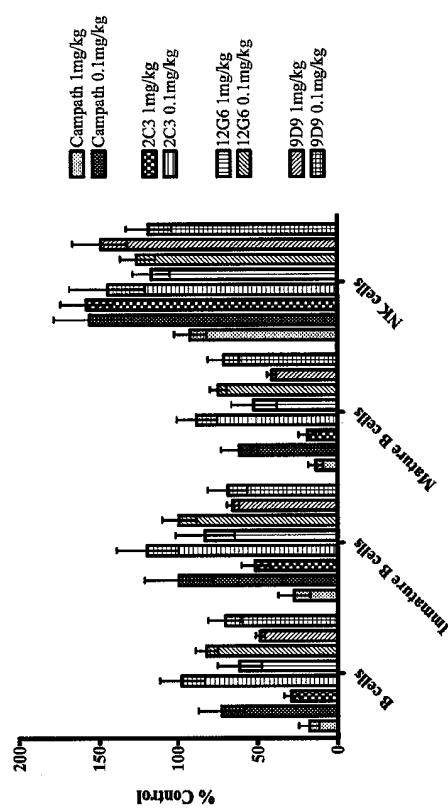
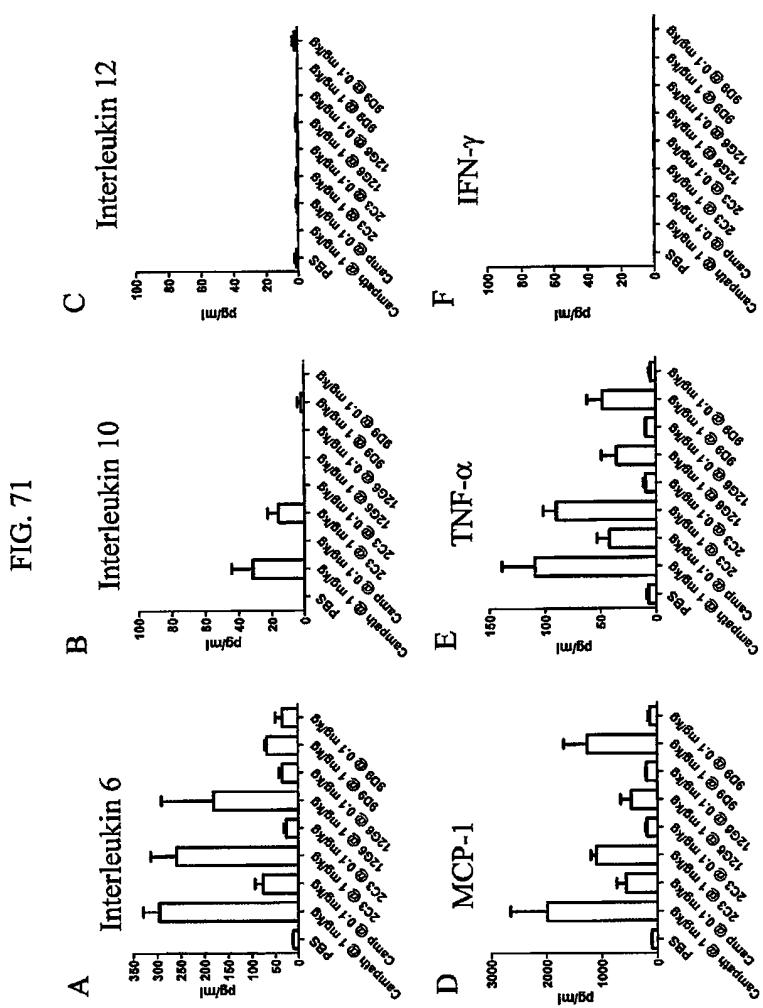
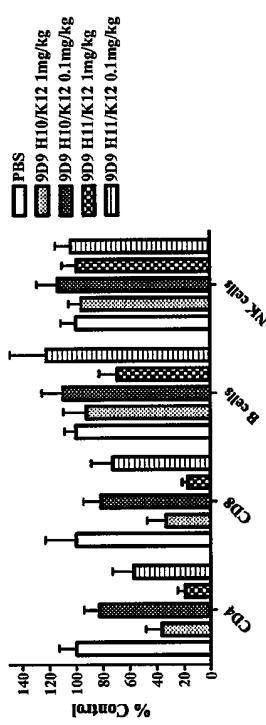
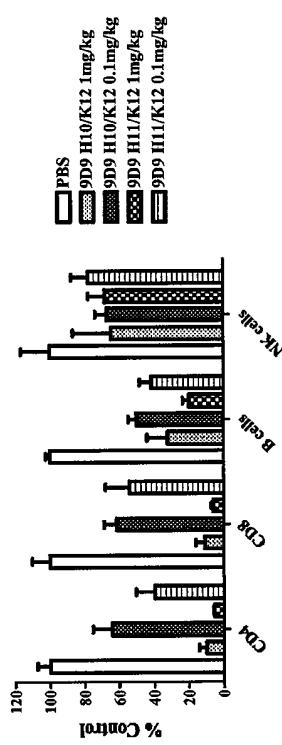


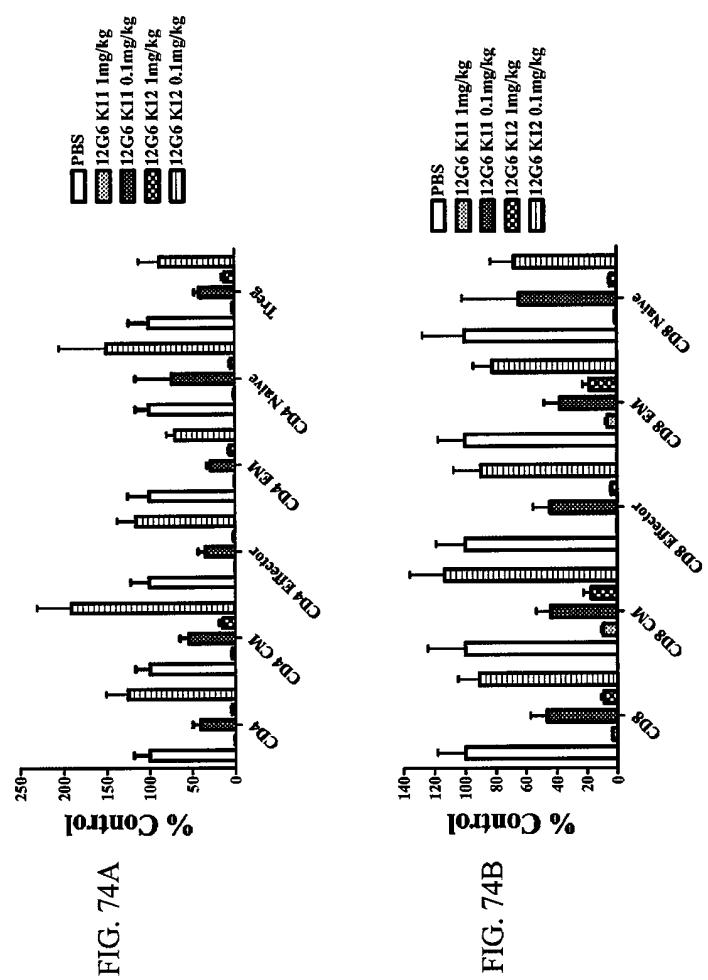
FIG. 70C

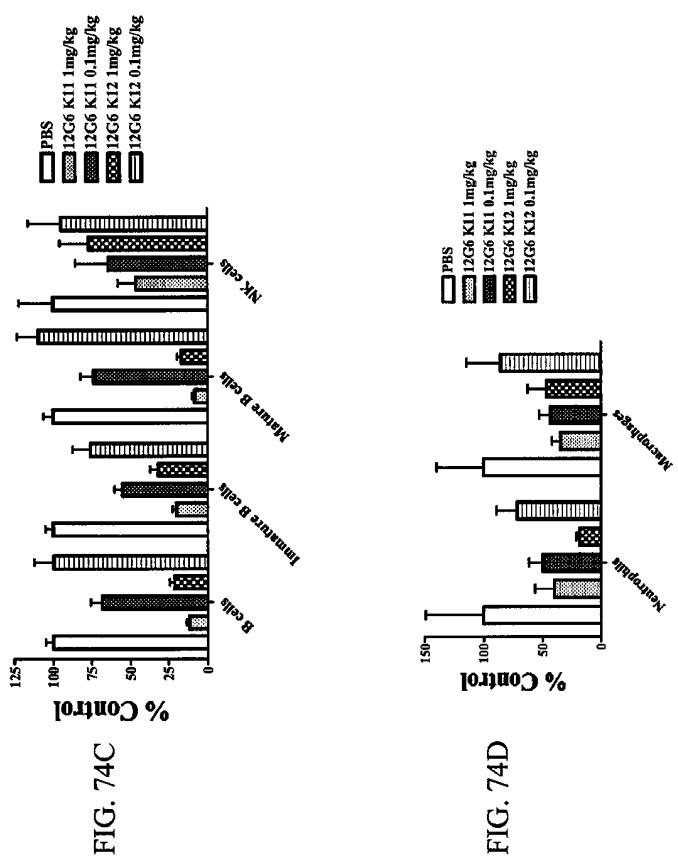
FIG. 70D

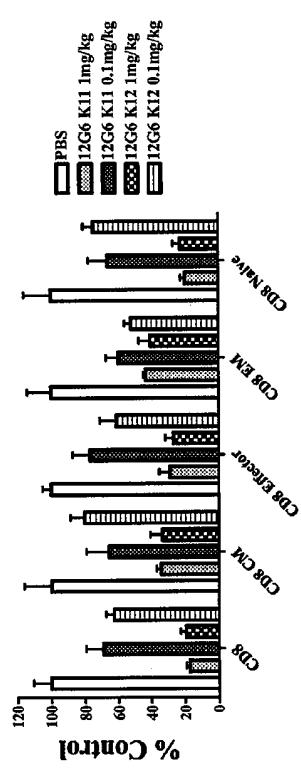
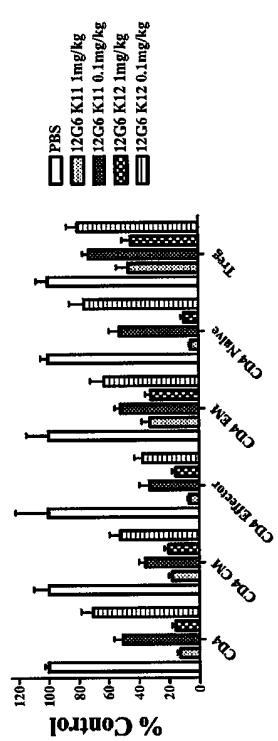












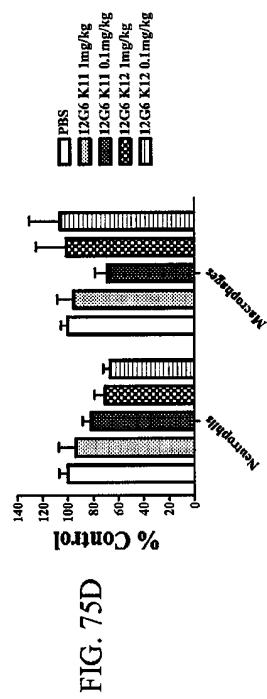
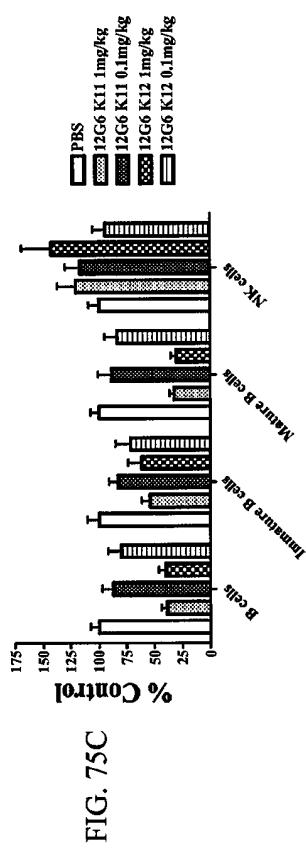
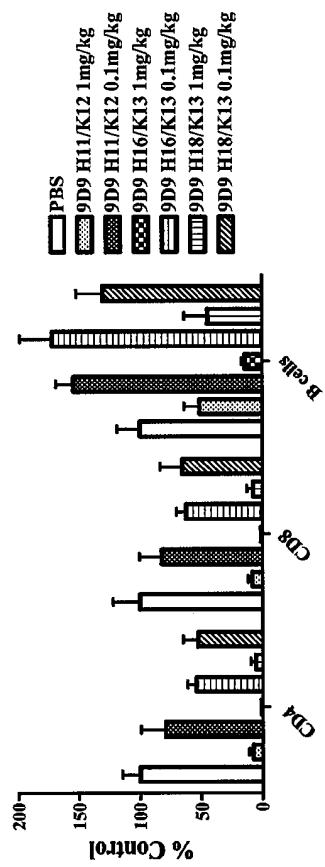


FIG. 76



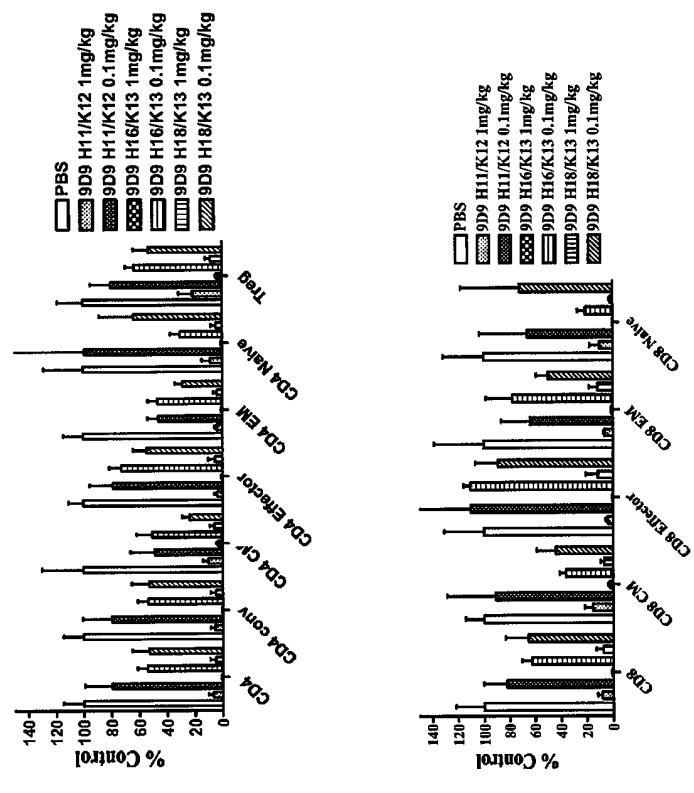
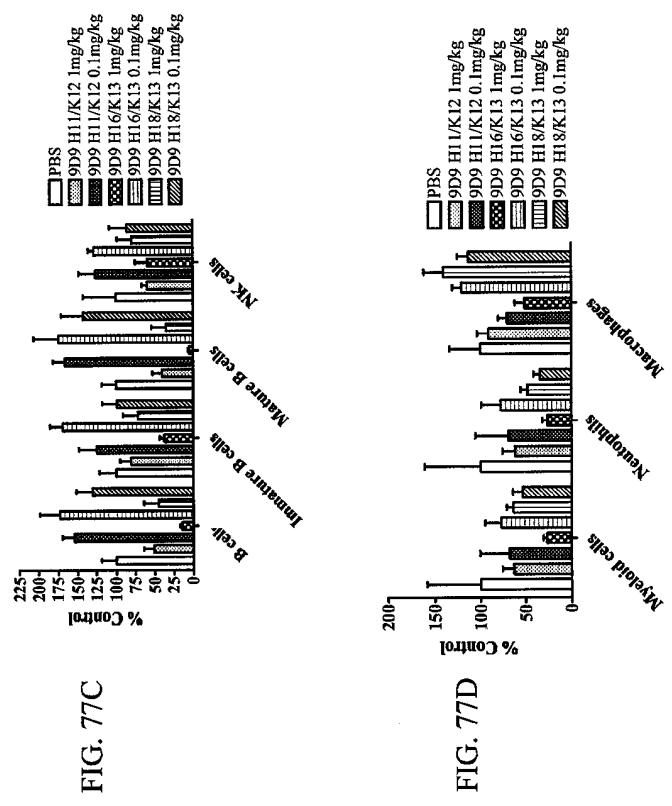
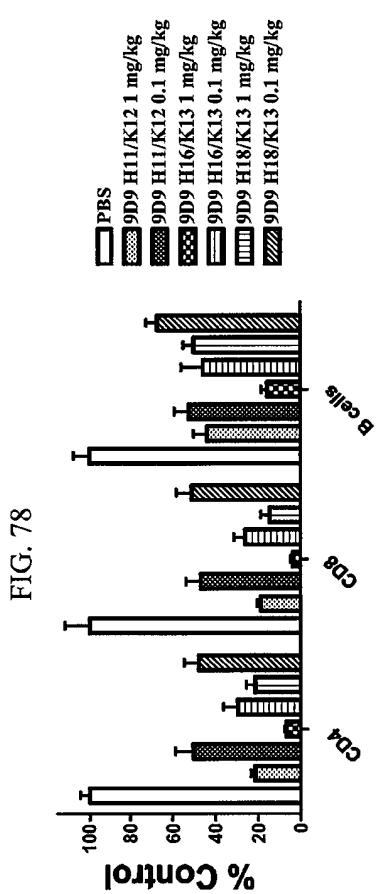


FIG. 77A

FIG. 77B





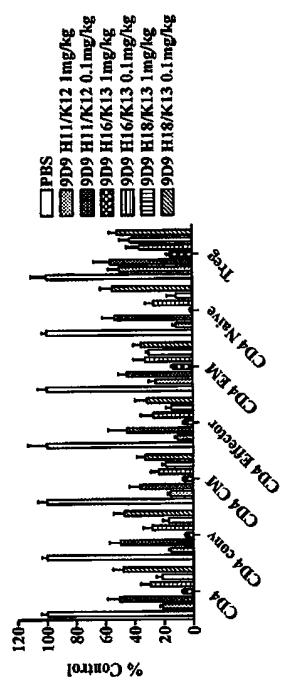


FIG. 79A

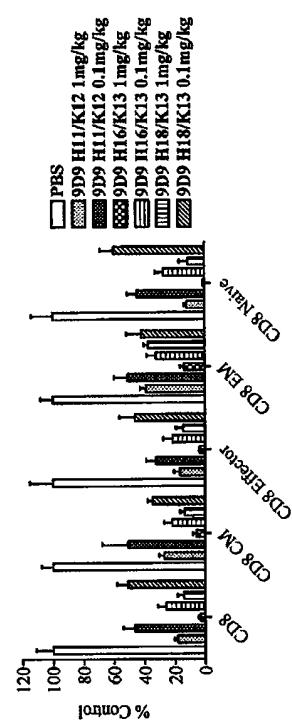


FIG. 79B

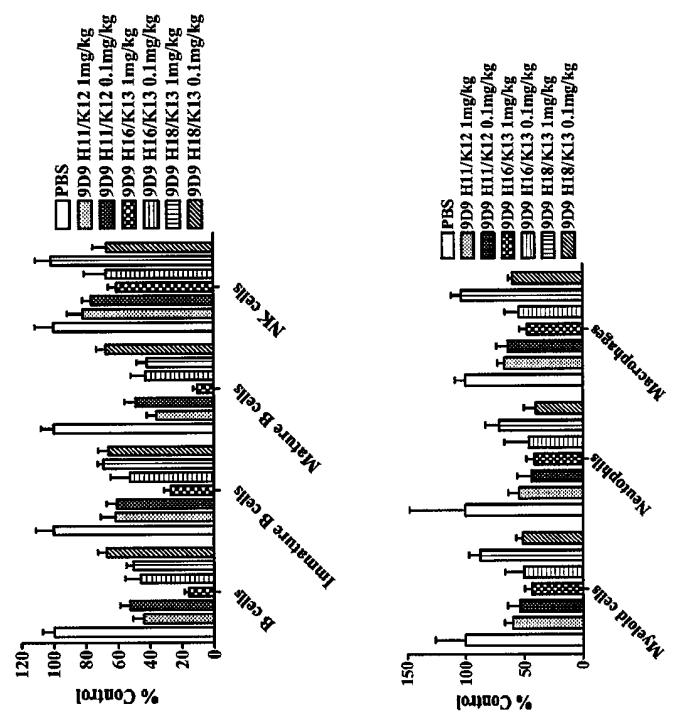


FIG. 79C

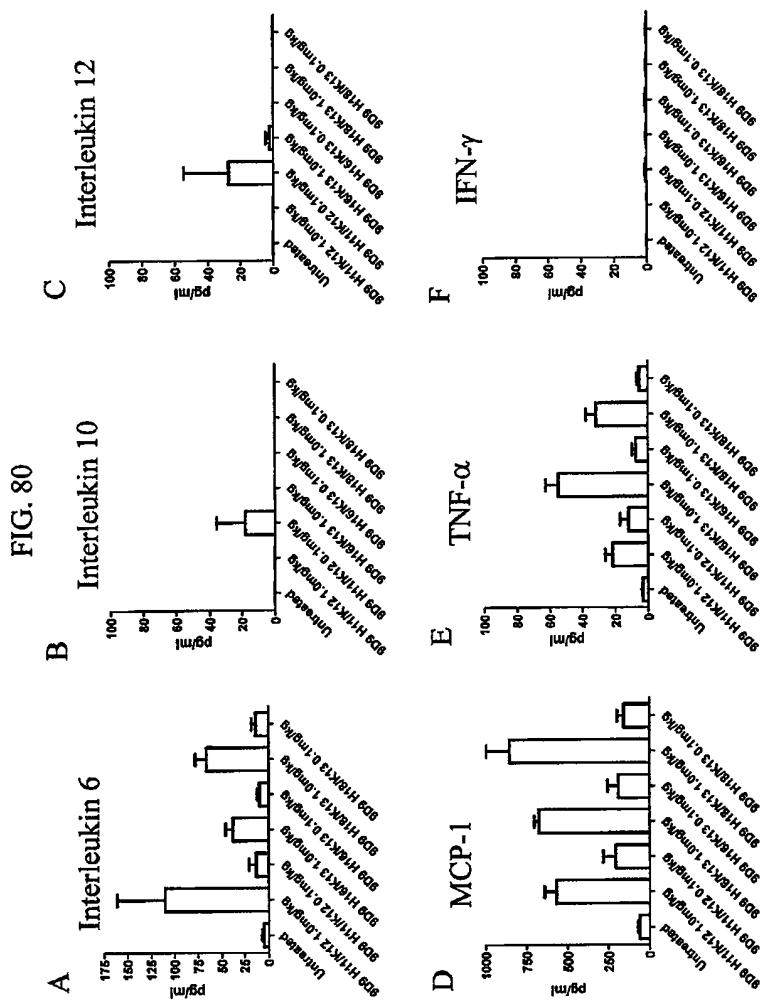
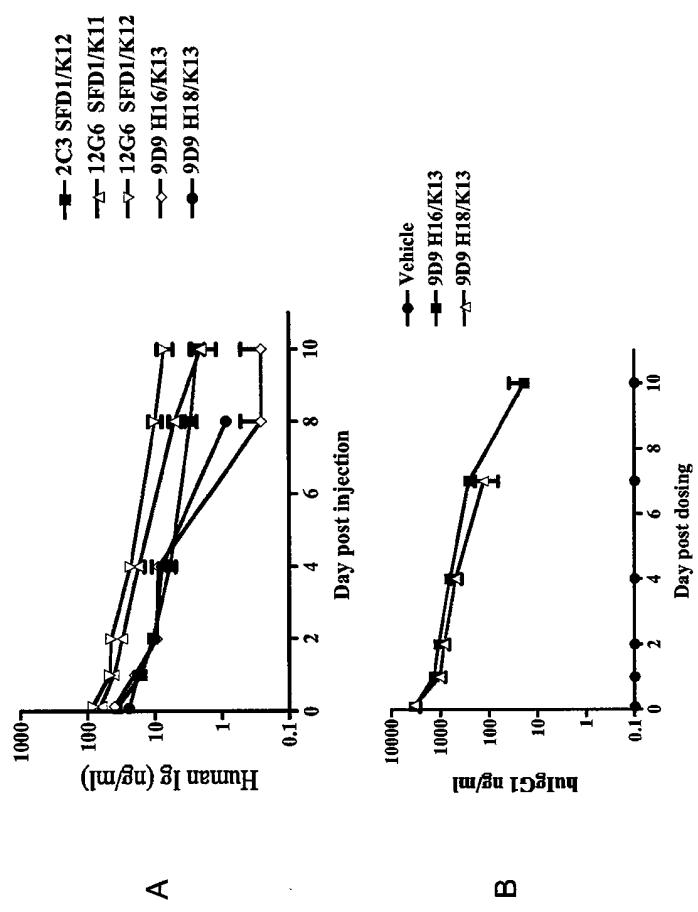
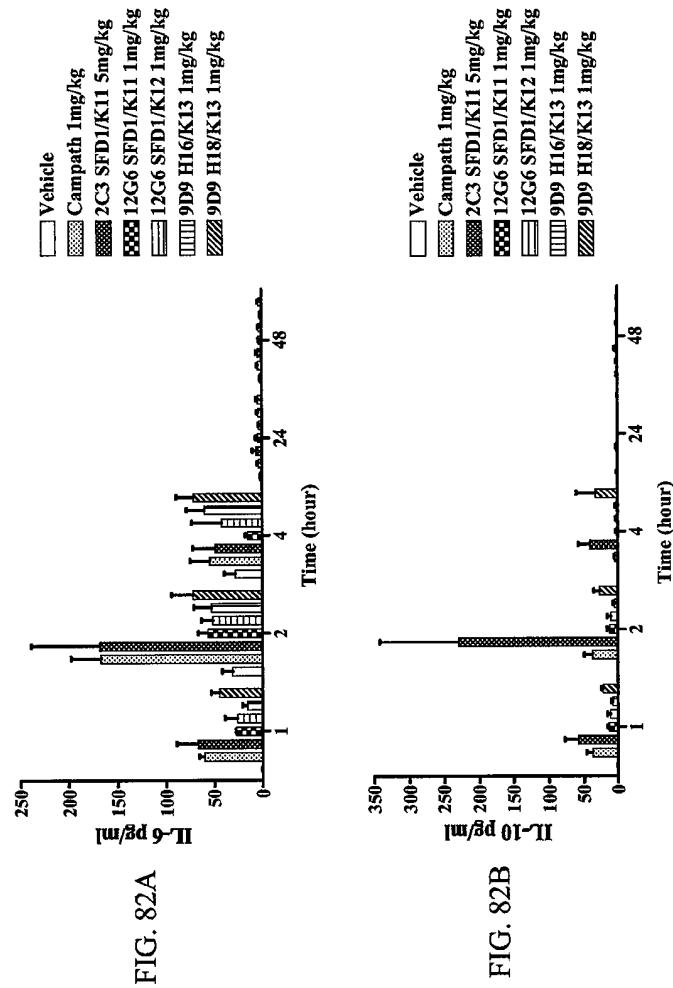
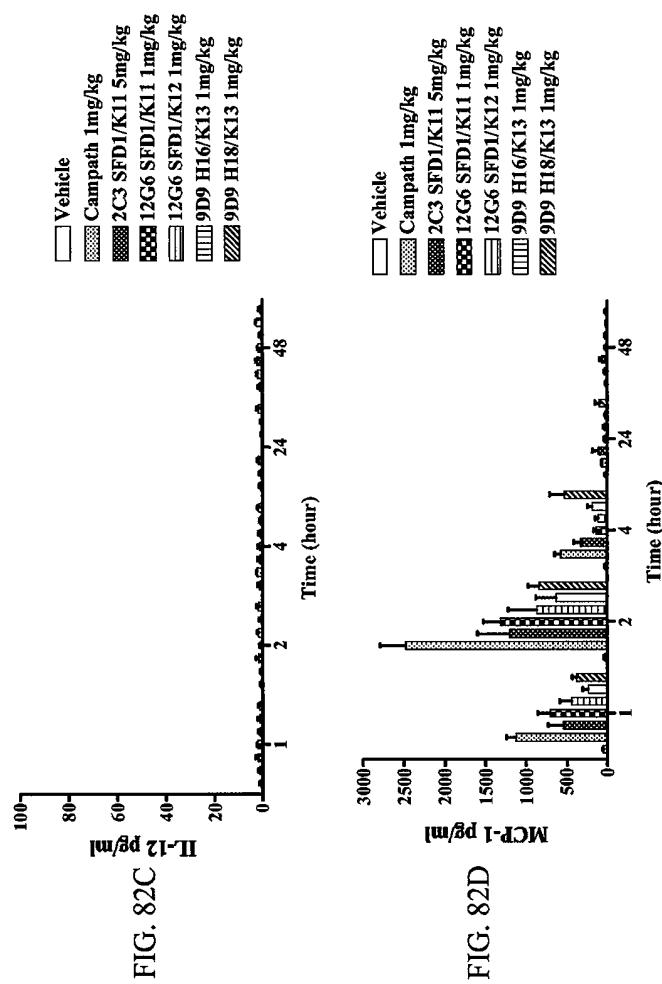


FIG. 81







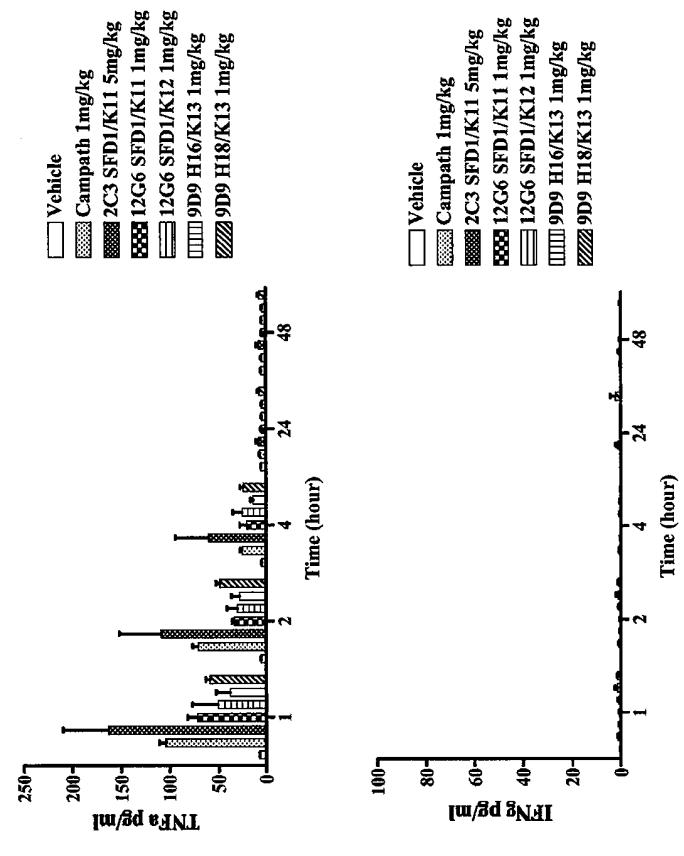
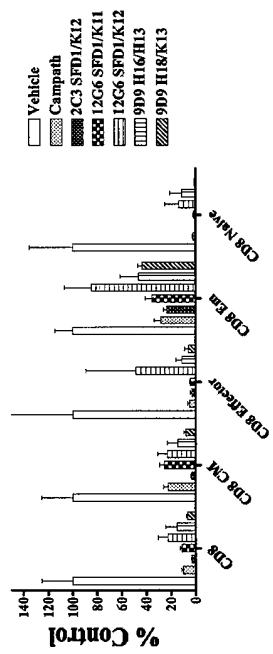
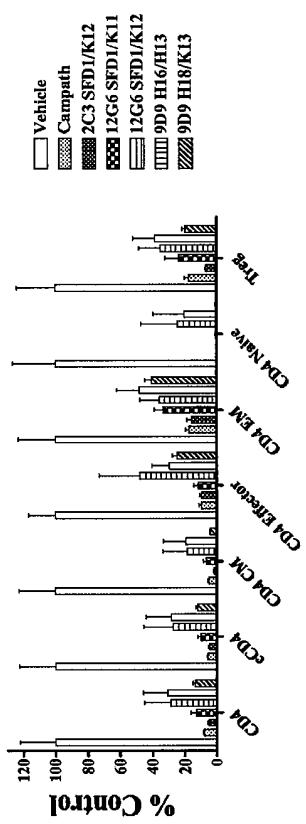


FIG. 82E



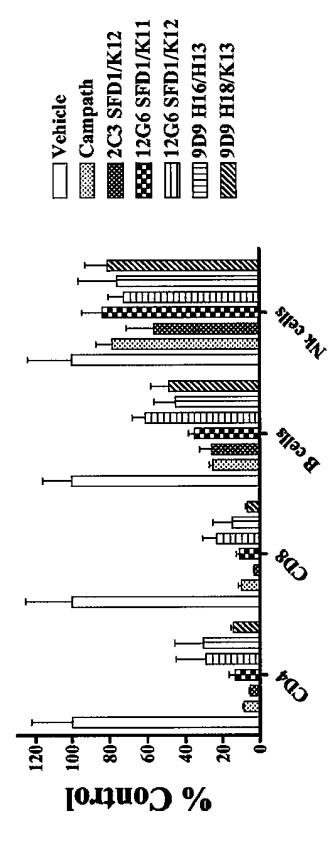
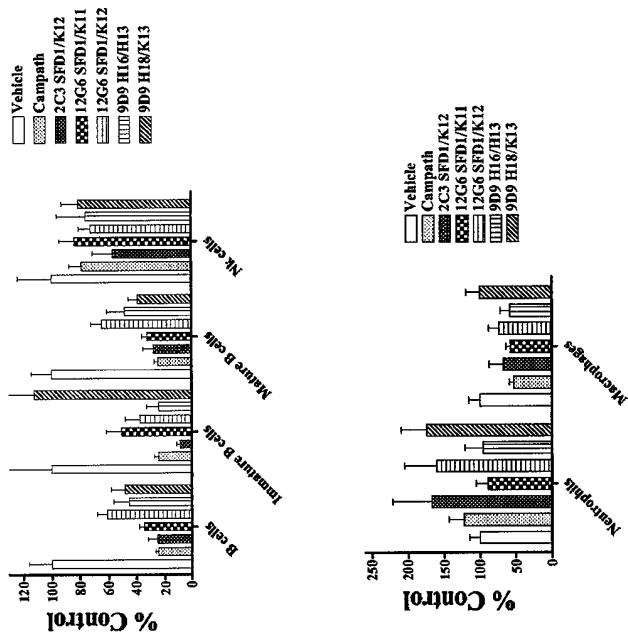
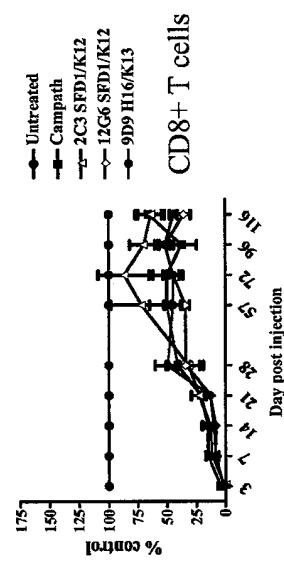
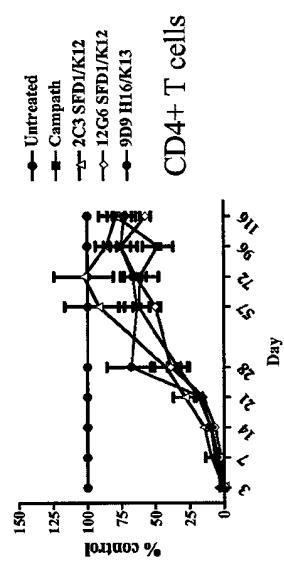
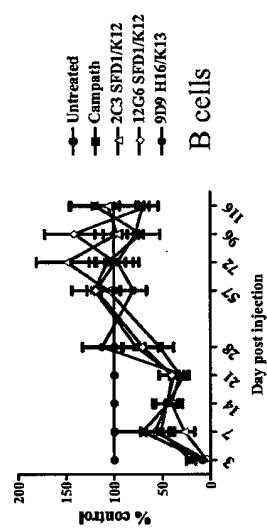
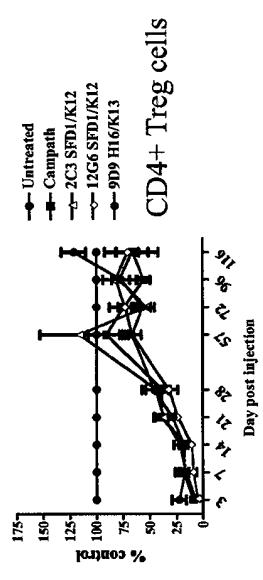
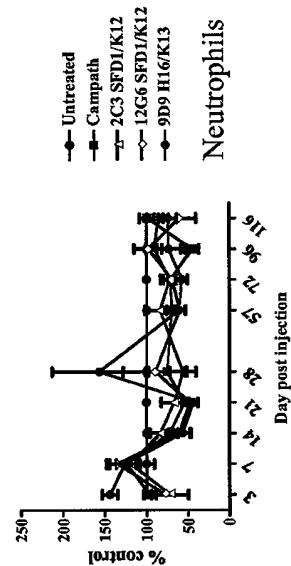
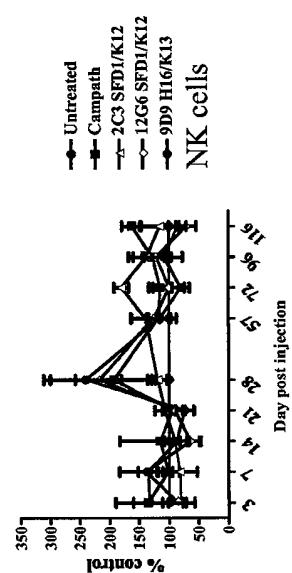


FIG. 83C









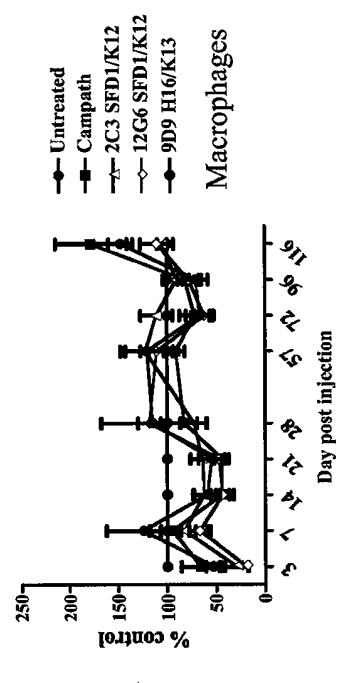


FIG. 84G

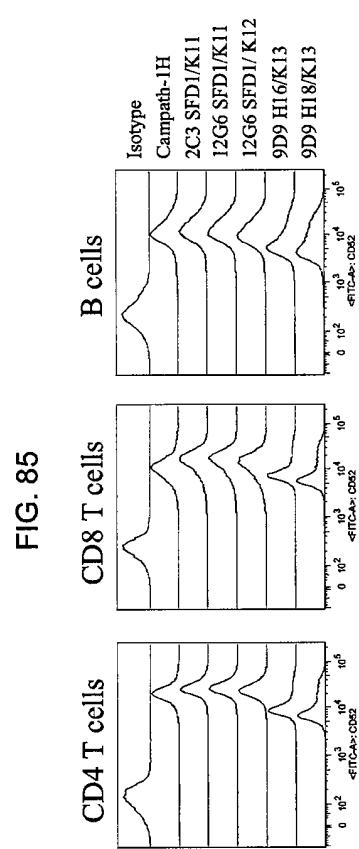
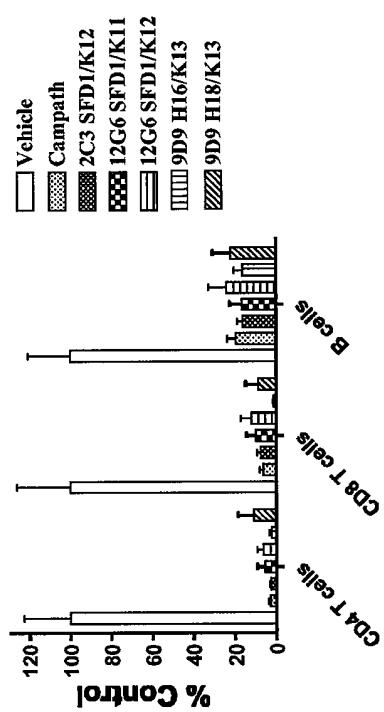


FIG. 86A



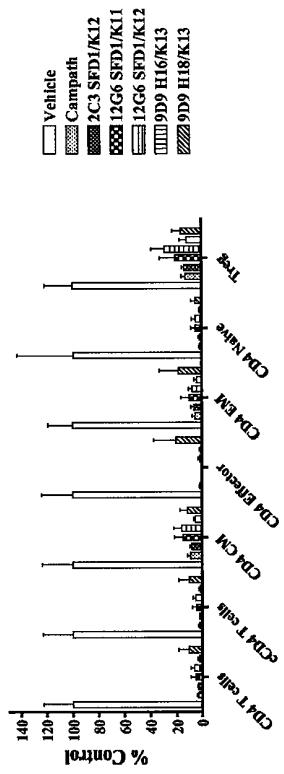


FIG. 86B

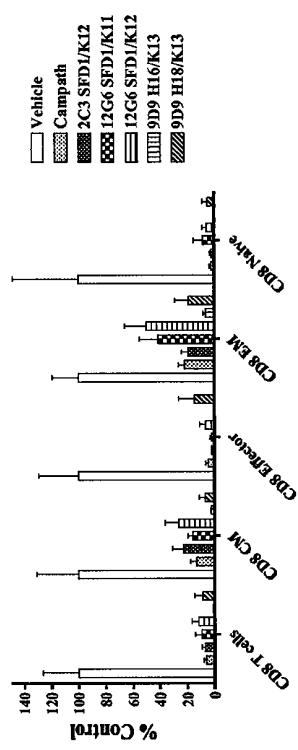


FIG. 86C

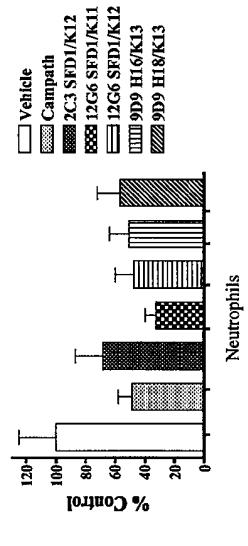
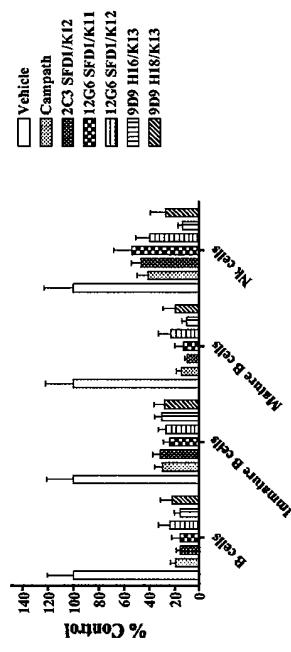
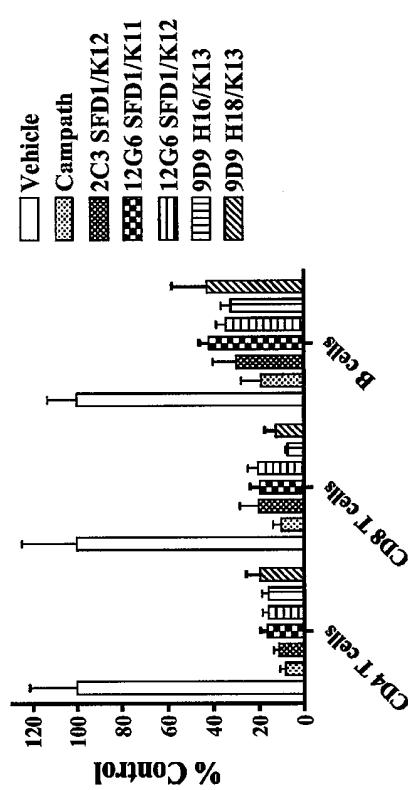


FIG. 87A



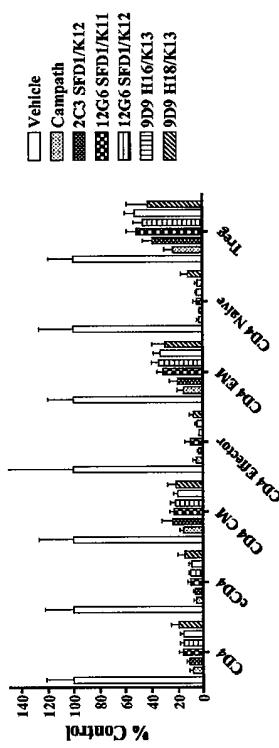


FIG. 87B

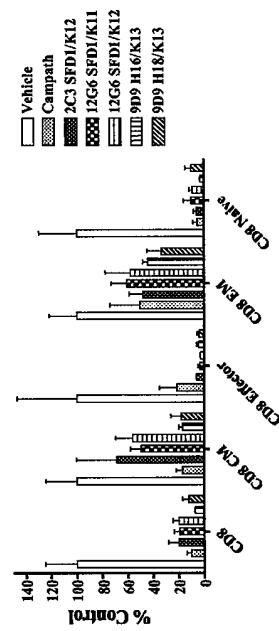


FIG. 87C

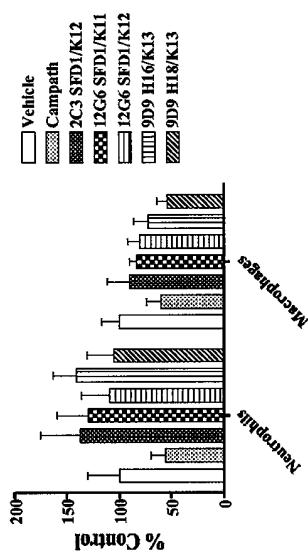
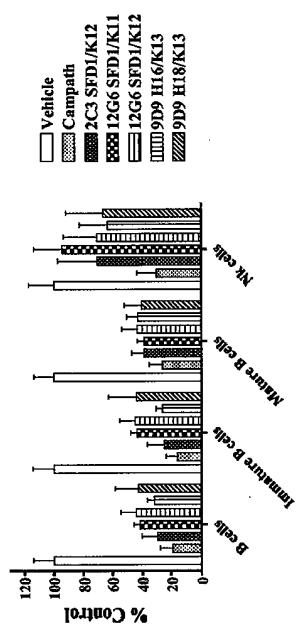
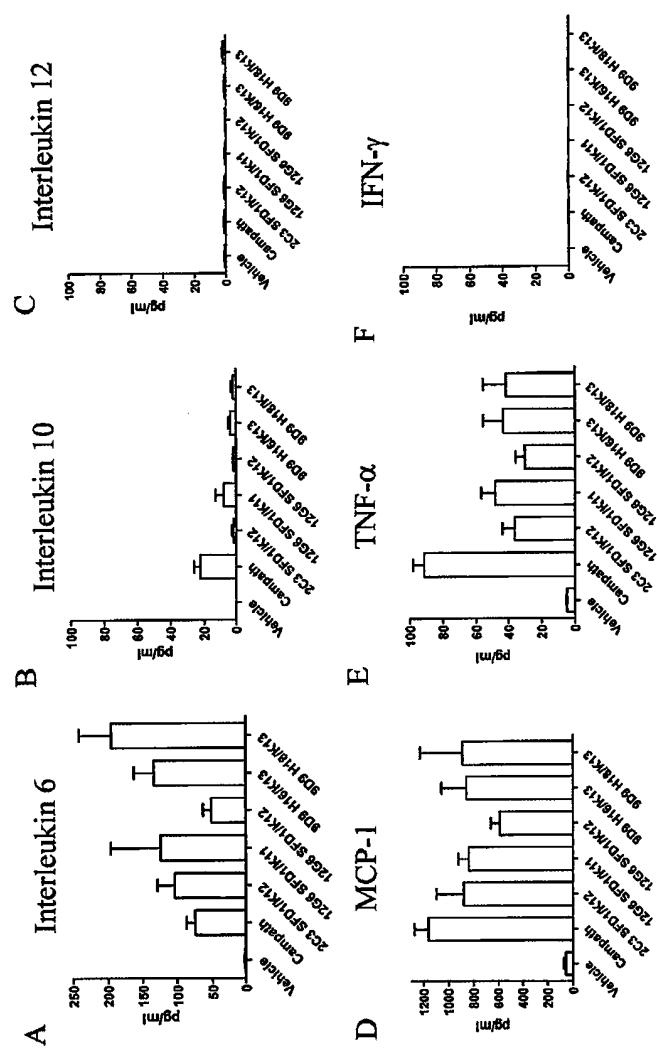
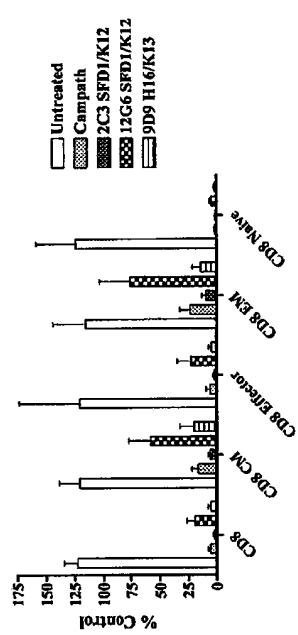
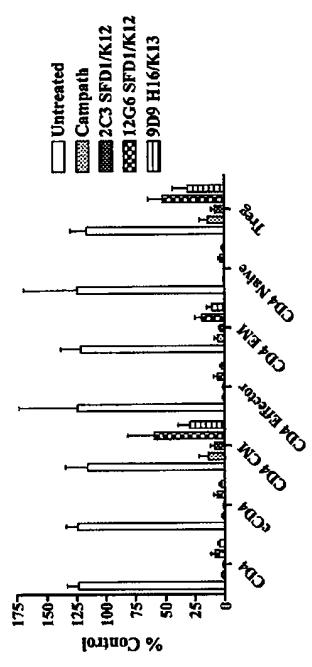
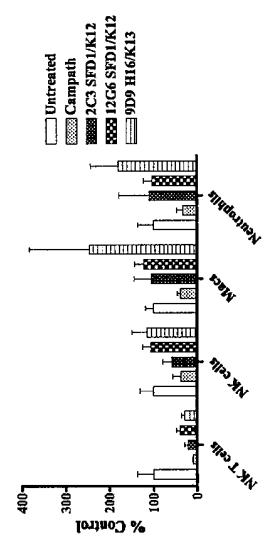
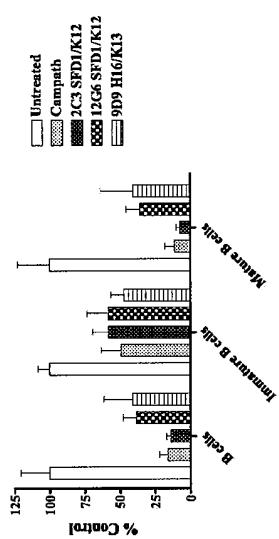
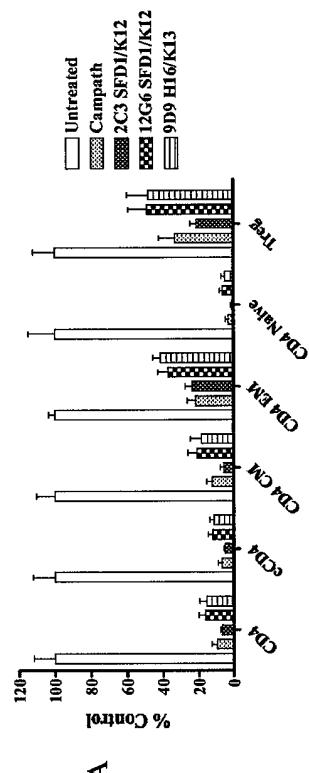


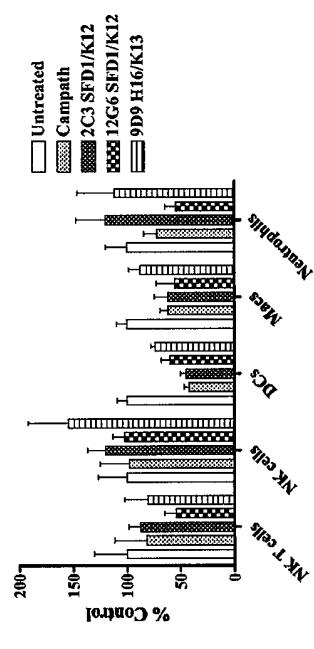
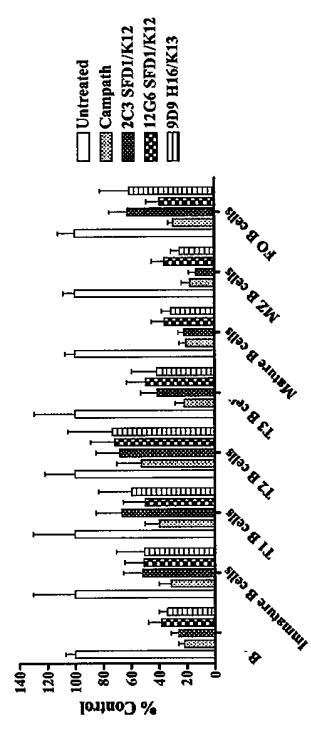
FIG. 88

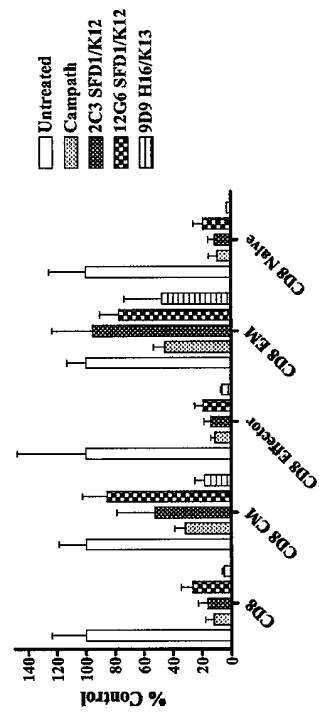
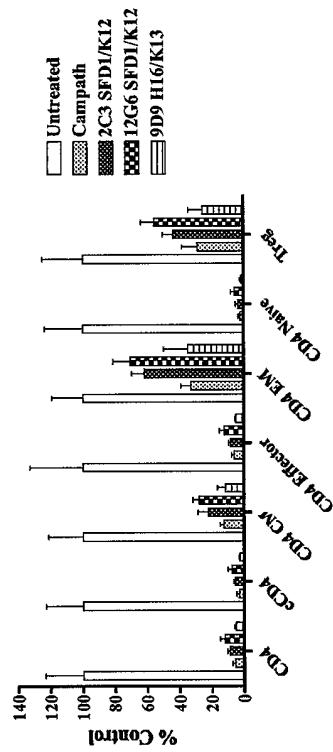












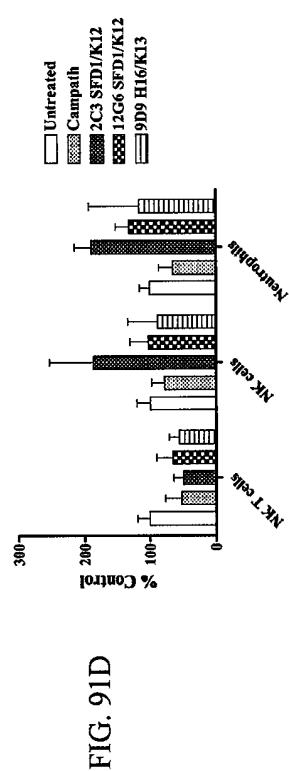
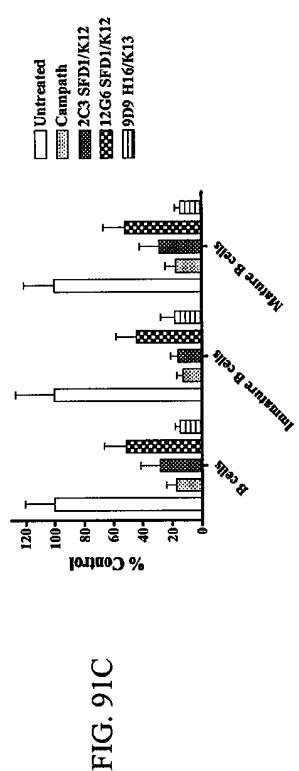


FIG. 92

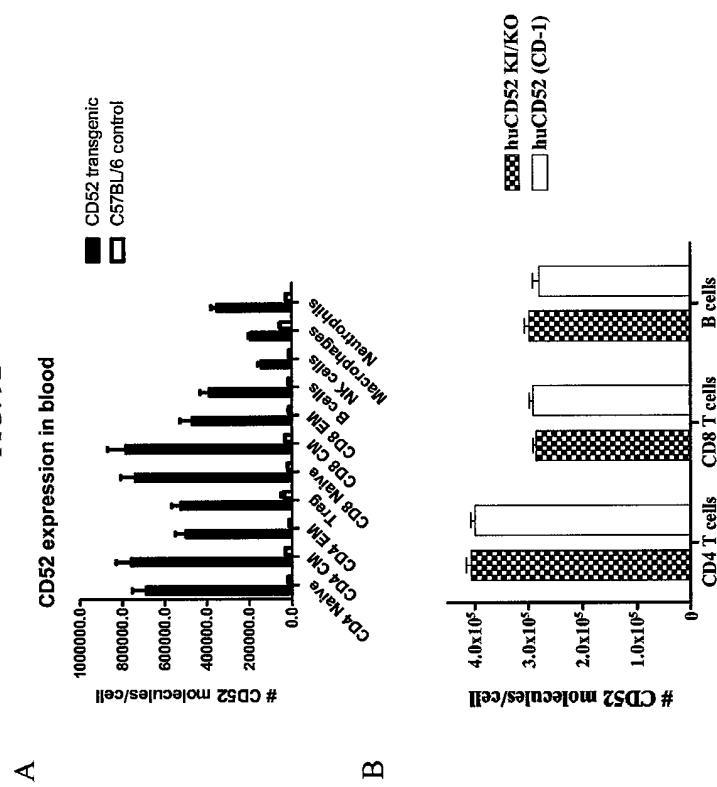
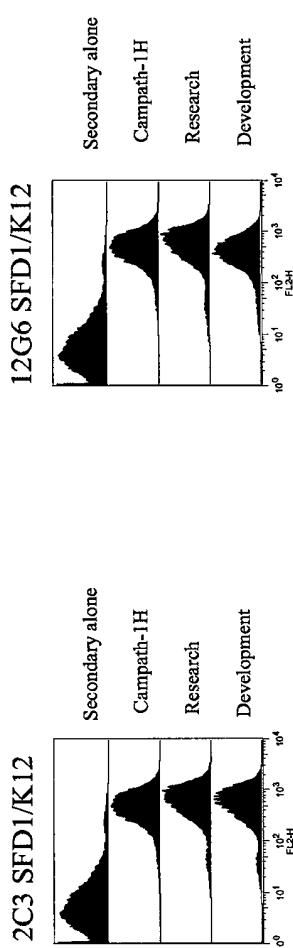
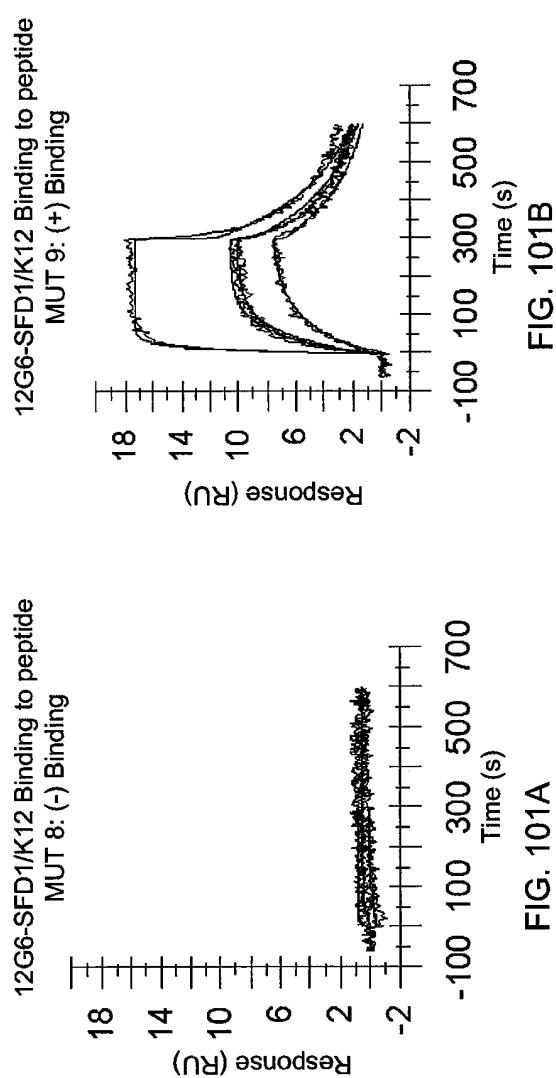


FIG. 93





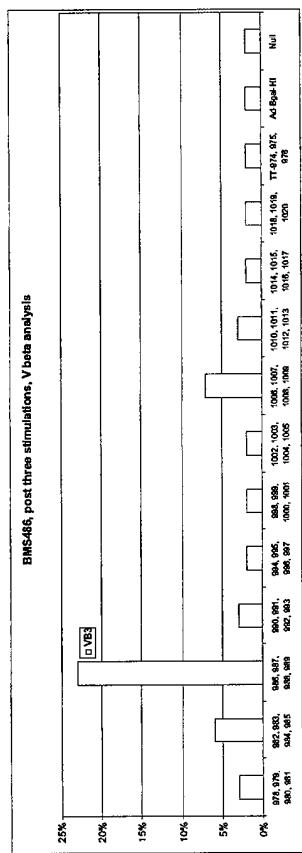
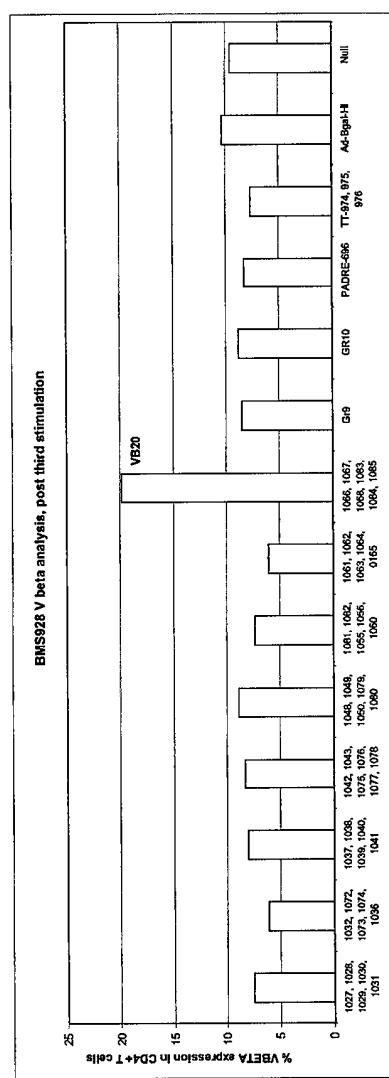


FIG. 102



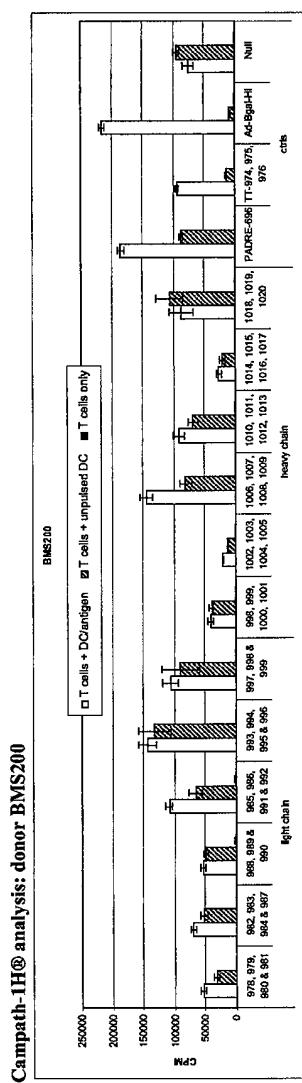


FIG. 104A

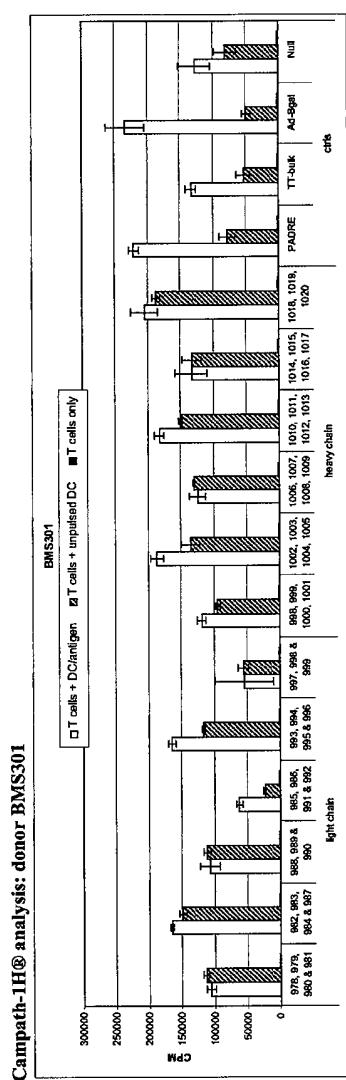


FIG. 104B

Campath-1H® analysis: donor BMS154

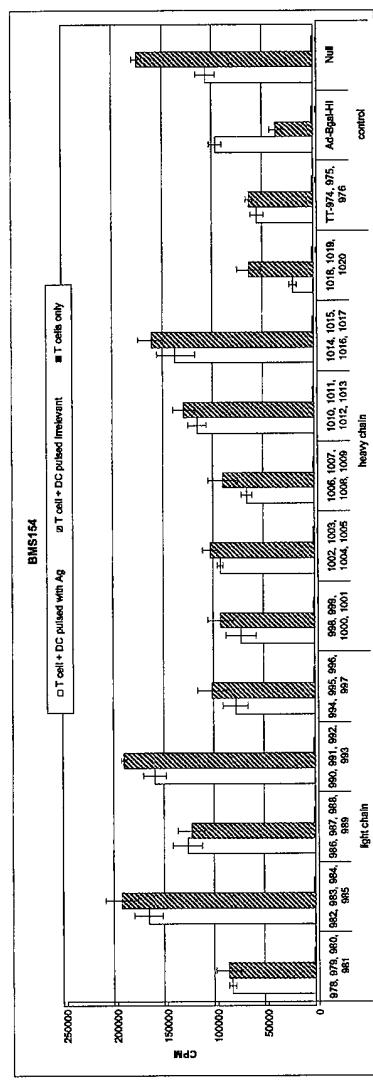


FIG. 104C

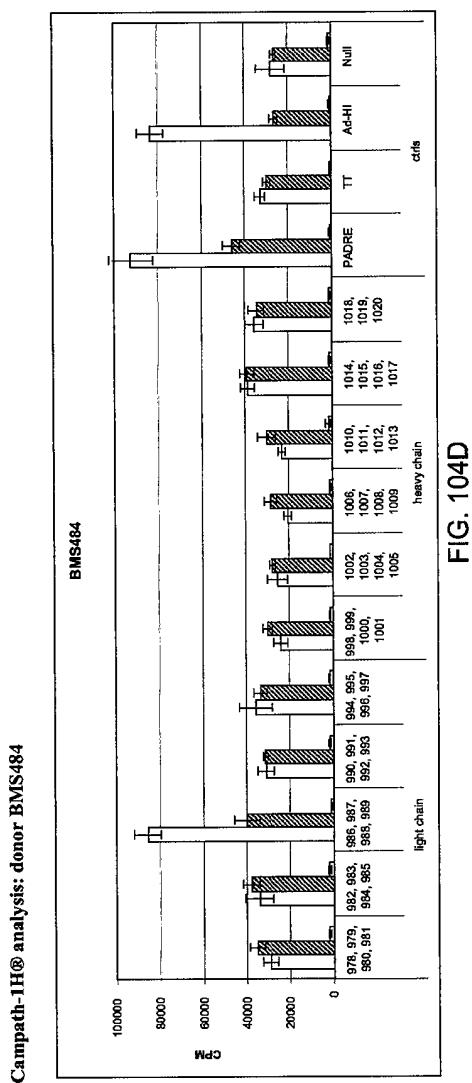


FIG. 104D

Campath-1H® analysis: donor BMS362

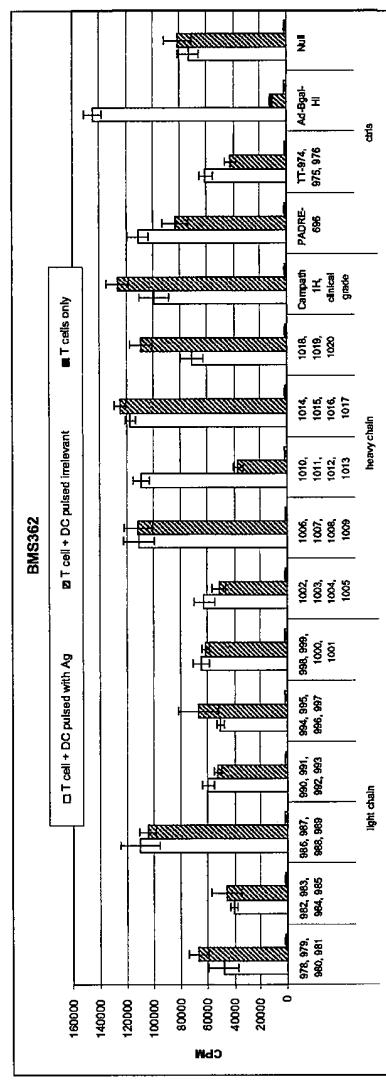


FIG. 104E

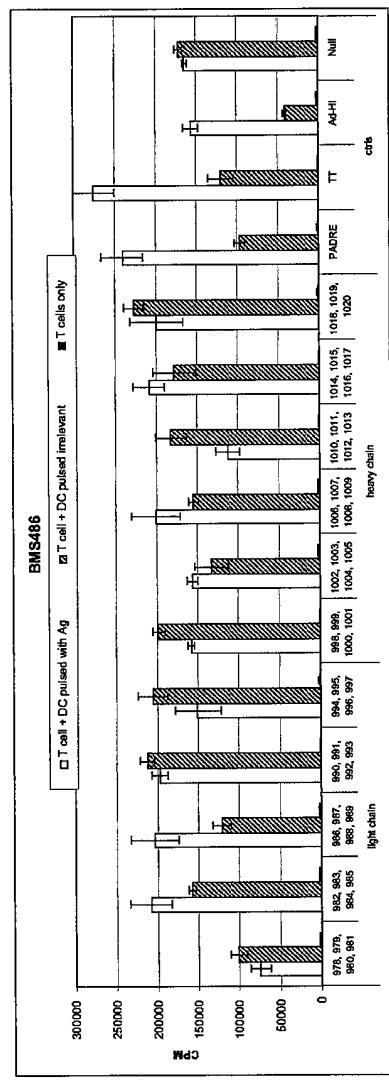
Campath-1H[®] analysis: donor BMS486

FIG. 104F

Campath-1H® analysis: donor BMS150

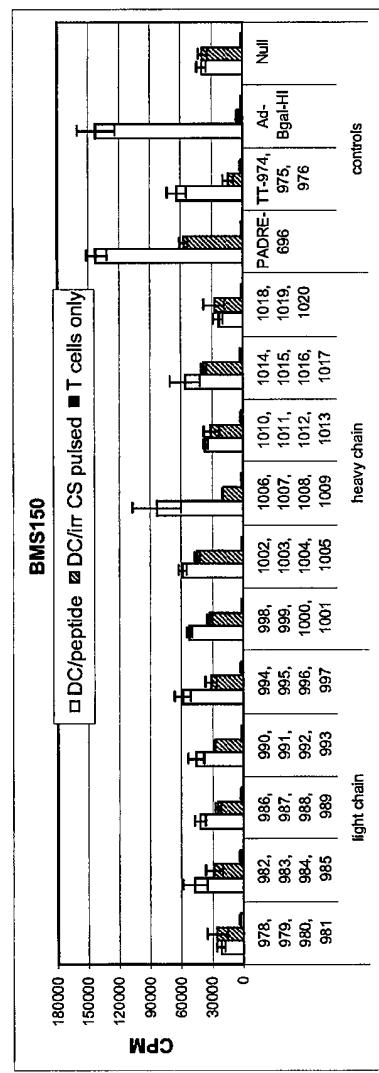


FIG. 104G

Campath-1H® analysis: donor BMS167

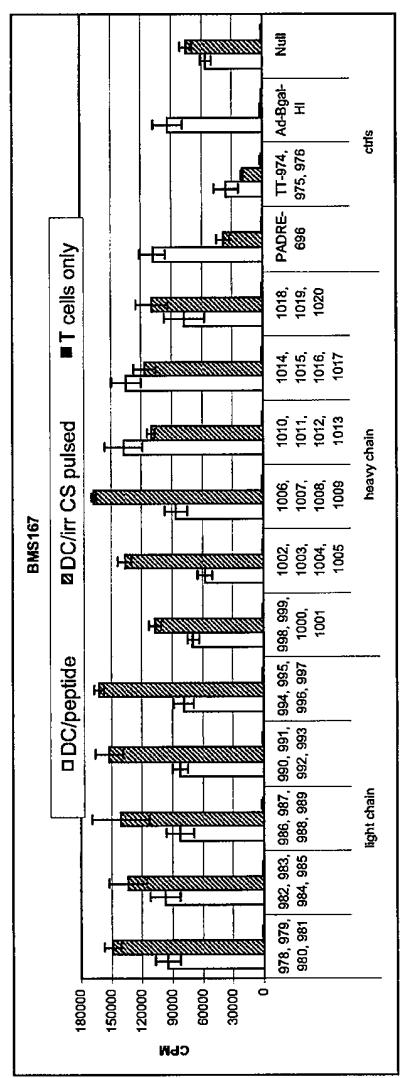


FIG. 104H

Campath-1H® analysis: donor BMS170

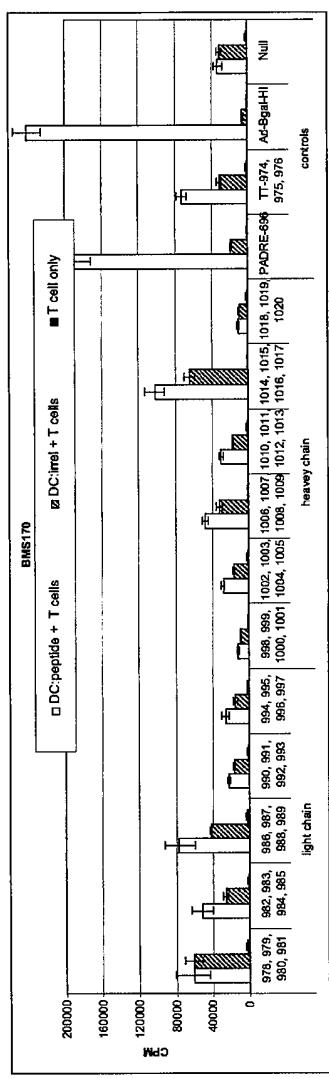
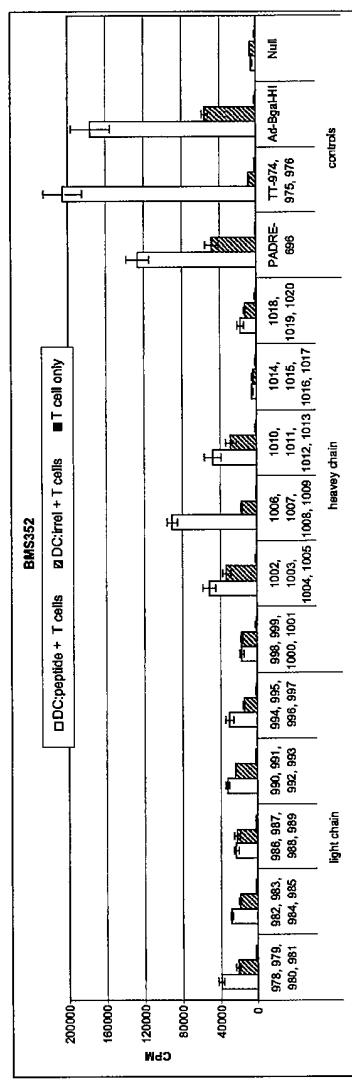


FIG. 104

Campath-1H® analysis: donor BMS352



12G6-SFD1/K12 analysis; donor BMS484

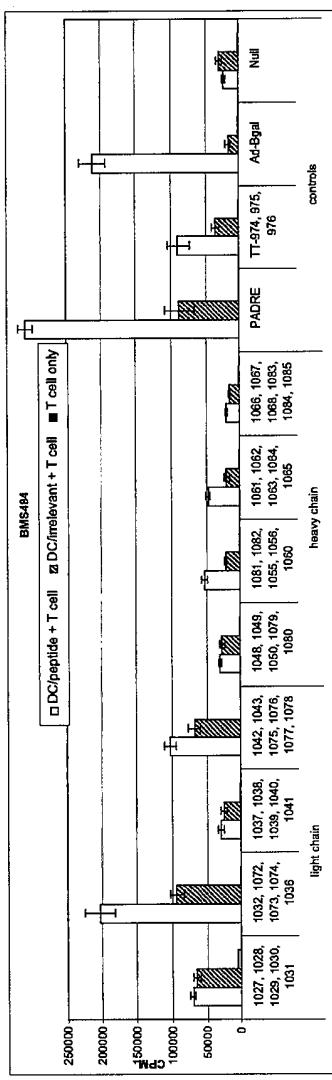


FIG. 105A

12G6-SF1/K12 analysis: donor BMS436

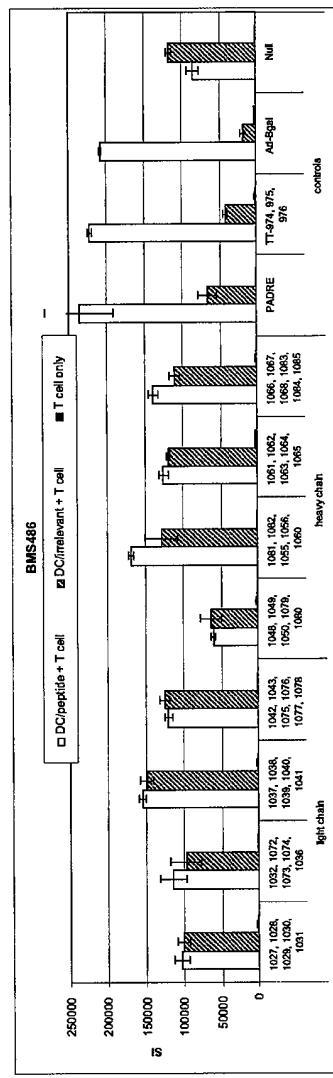


FIG. 105B

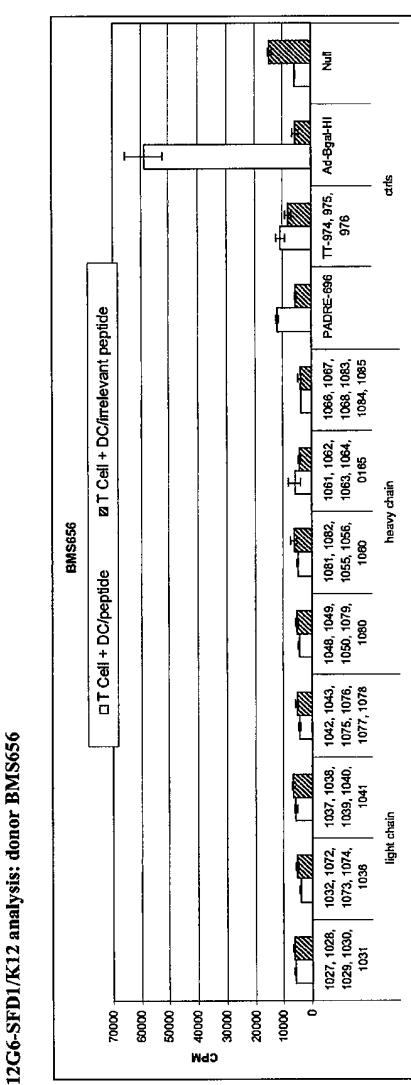


FIG. 105C

12G6-SFD1/K12 analysis: donor BMS640

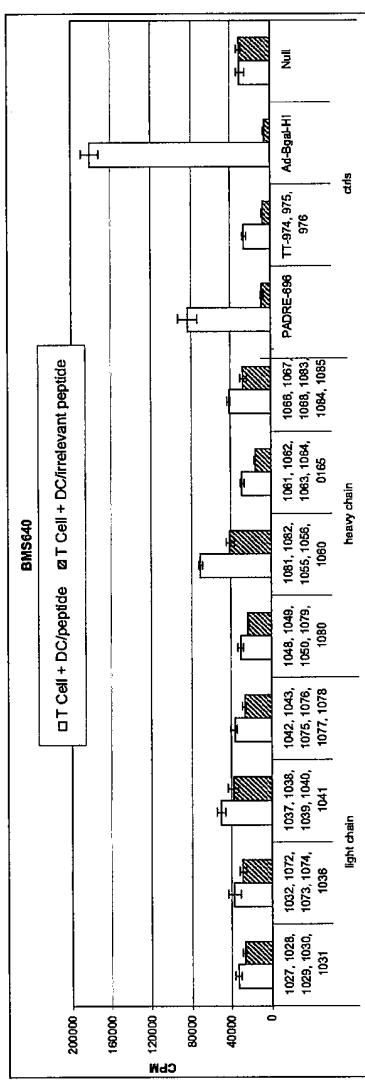


FIG. 105D

12G6-SFDI/K12 analysis; donor BMSS61

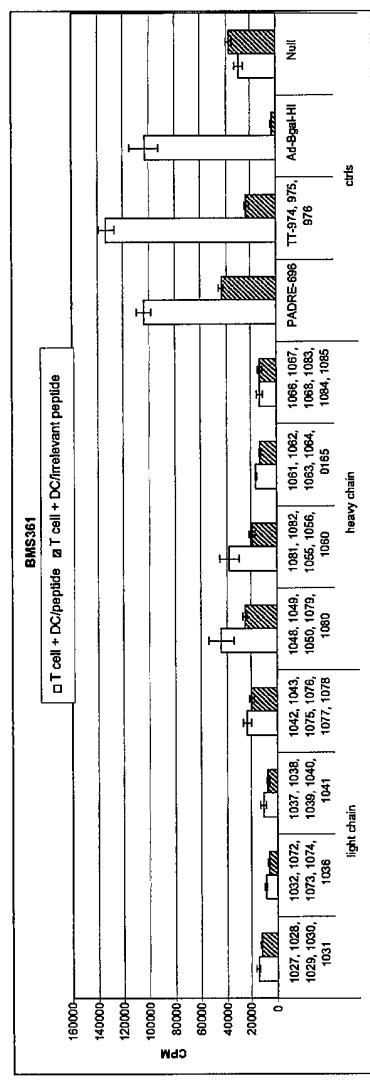


FIG. 105E

12G6-SFD1/KL12 analysis; donor BMS165

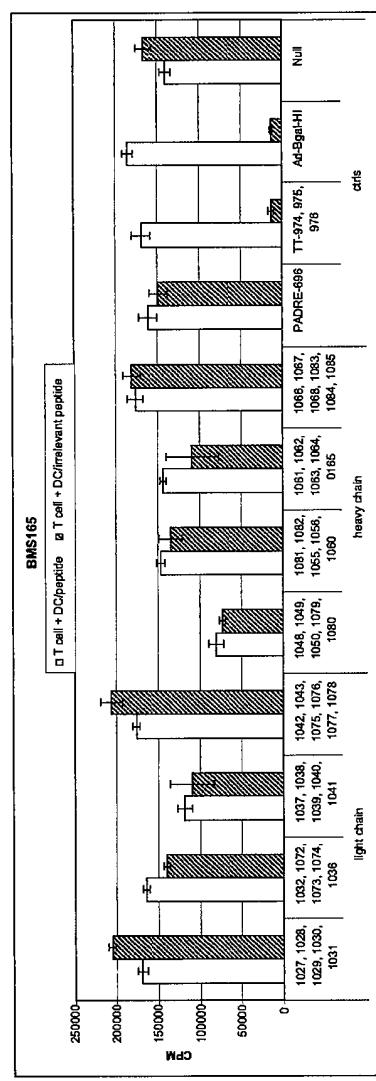


FIG. 105F

12G6-SFD1/K12 analysis: donor BMS902

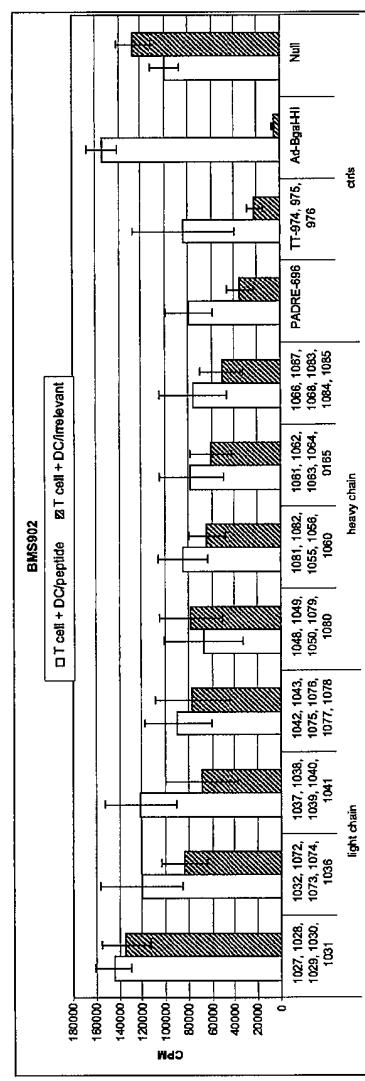


FIG. 105G

12G6-SF1/K12 analysis: donor BMS928

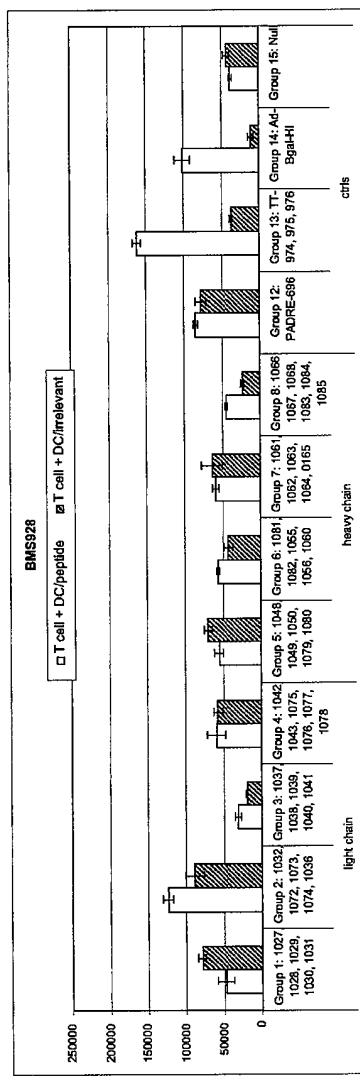


FIG. 105H

12G6-SFD1/K12 analysis: donor BMS927

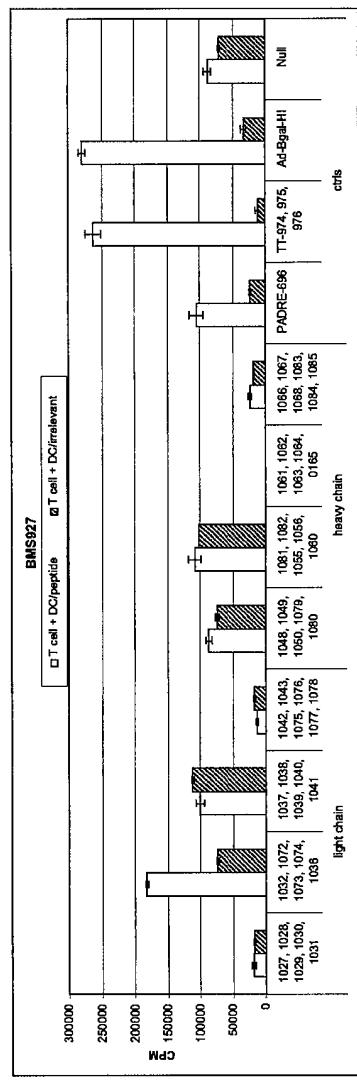


FIG. 105|

12G6-SFD1/K12 analysis: donor BMS963

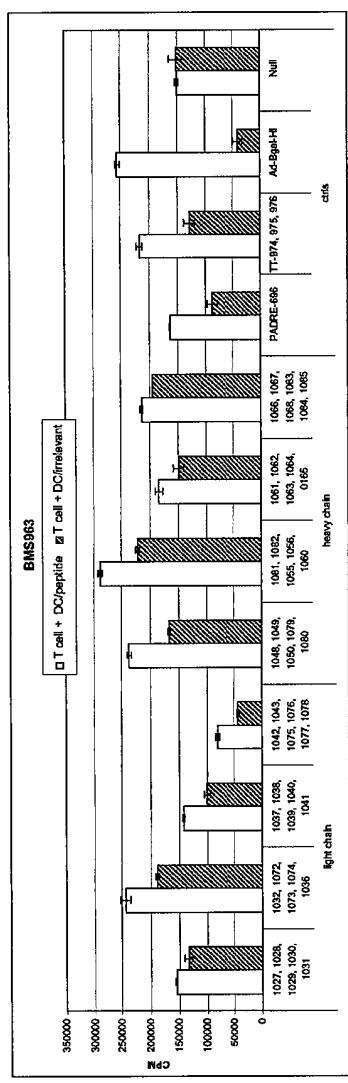


FIG. 105J

Humanized 2C3 clone full-length heavy chain sequence

2C3-SFD1

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVRQAPGKGLEWVQCIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTTVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 272)

Humanized 2C3 clone full-length light chain sequence

2C3-K12

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLYSNGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLYLVSKLDSCGVPDFRFSGSQGTDFTLKRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSSLSTLTSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 273)

FIG. 106

Humanized 7F11 clone full-length heavy chain sequence

7F11-SFD1

**MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLVESGGLVQPGGLRLSCAASGFTFTDYYMSWV
RQAPGKGLEWVG**FIRNKANGYTTENASVKG**RFTISRDLQMNSLKTEDTA****
VYYCTRYIFDDYWQGQTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESEN
GOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK (SEQ ID NO: 274)**

Humanized 7F11 clone full-length light chain sequence

7F11-K2

**MEAPAQLLFLLLWLPDTTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNSYLH
WYLOKPGOSPQLIYMVSNRFSGVPDRFTSGSGSGTDFTLKISVEADVGVYYCSQSTH**
VPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO: 275)

FIG. 107

Humanized 9D9 clone full-length heavy chain sequences

9D9-H16

**MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWV
RQAPGKGLELVEIRNKA
KNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCTTLD
SWGQGT
TVT
VSSA
STKGPSVFL
P
APSSK
STSG
GTAA
LGCL
VKDY
FPEPV
TVS
WNS
GALT
SGV
HTFP
AVL
QSSG
LYS
LSSV
VT
VP
SS
LGT
QTY
IC
CN
V
NH
K
PS
NT
KV
DK
K
VE
PK
SC
DK
T
H
TC
PP
CA
PE
LL
GG
PSV
FL
F
PP
K
PK
D
TL
M
I
S
R
T
P
E
V
TC
V
V
D
V
S
H
E
D
P
E
V
K
F
N
WY
V
D
G
V
E
V
H
N
A
K
T
K
P
R
E
E
Q
Y
N
S
T
Y
R
V
V
S
L
T
V
L
H
Q
D
W
L
N
G
K
E
Y
K
C
K
V
S
N
K
A
L
P
A
I
E
K
T
I
S
K
A
K
G
Q
P
R
E
P
Q
V
Y
T
L
P
P
S
R
D
E
L
T
K
N
Q
V
S
L
T
C
L
V
K
G
F
Y
P
S
D
I
A
V
E
W
E
S
N
G
Q
P
E
N
N
Y
K
T
P
P
V
L
D
S
D
G
S
F
F
L
Y
S
K
L
T
V
D
K
S
R
W
Q
Q
G
N
V
F
S
C
S
V
M
H
E
A
L
H
N
H
Y
T
Q
K
S
L
S
P
G
K**
(SEQ ID NO: 276)

9D9-H18

**MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWV
RQAPGKGLELVA
EIRNKA
KNHATYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCTTLD
SWGQGT
TVT
VSSA
STKGPSVFL
P
APSSK
STSG
GTAA
LGCL
VKDY
FPEPV
TVS
WNS
GALT
SGV
HTFP
AVL
QSSG
LYS
LSSV
VT
VP
SS
LGT
QTY
IC
CN
V
NH
K
PS
NT
KV
DK
K
VE
PK
SC
DK
T
H
TC
PP
CA
PE
LL
GG
PSV
FL
F
PP
K
PK
D
TL
M
I
S
R
T
P
E
V
TC
V
V
D
V
S
H
E
D
P
E
V
K
F
N
WY
V
D
G
V
E
V
H
N
A
K
T
K
P
R
E
E
Q
Y
N
S
T
Y
R
V
V
S
L
T
V
L
H
Q
D
W
L
N
G
K
E
Y
K
C
K
V
S
N
K
A
L
P
A
I
E
K
T
I
S
K
A
K
G
Q
P
R
E
P
Q
V
Y
T
L
P
P
S
R
D
E
L
T
K
N
Q
V
S
L
T
C
L
V
K
G
F
Y
P
S
D
I
A
V
E
W
E
S
N
G
Q
P
E
N
N
Y
K
T
P
P
V
L
D
S
D
G
S
F
F
L
Y
S
K
L
T
V
D
K
S
R
W
Q
Q
G
N
V
F
S
C
S
V
M
H
E
A
L
H
N
H
Y
T
Q
K
S
L
S
P
G
K**
(SEQ ID NO: 277)

Humanized 9D9 clone full-length light chain sequence

9D9-K13

**MEAPAQLLFLLLWLPDTTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNW
LLQKPGQSPQR
LIYLV
S
AL
D
S
G
V
P
D
R
F
S
G
S
G
T
D
F
T
L
K
I
S
R
V
E
A
E
D
V
G
V
Y
Y
C
W
Q
G
T
H
F
P
W
T
F
Q
G
T
K
L
E
I
K
R
T
V
A
A
P
S
V
I
F
P
P
S
D
E
Q
L
K
S
G
T
A
S
V
V
C
L
L
N
F
Y
P
R
E
A
K
V
Q
W
K
V
D
N
A
L
Q
S
G
N
S
Q
E
S
V
T
E
Q
D
S
K
D
S
T
Y
S
L
S
S
T
L
T
L
S
K
A
D
Y
E
K
H
K
V
Y
A
C
E
V
T
H
Q
G
L
S
S
P
V
T
K
S
F
N
R
G
E
C
(SEQ ID NO: 278)**

FIG. 108

Humanized 12G6 clone full-length heavy chain sequence

12G6-SFD1

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMN
WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE
DTAVYYCTPIDYWQGQTTVTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP
EPVTIVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPSEQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 279)

Humanized 12G6 clone full-length light chain sequence

12G6-K12

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGDIVMTQTPLSLSVTPGPQAPASICKSSOSLLYSNGKTYL
NWVLQKPGQSPQRILYLVSKLD\$GVPDFRGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCVO
GSHFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYREAKVQWK
VDNALQSGNSQEVTEQDSKDSTYSLSSLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 280)

FIG. 109

Humanized 4B10 clone full-length heavy chain sequence

4B10-H1

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDDYYMSW
VRQAPGKGLBVGFI***RNKANGYTTEYSAVKG******RFTISRDDS******KNSLYLQMNSLKTED***
TAVYYCARYIWFDYWGQGT***TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD***
YFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP***AVLQSSGLYSLSSVTV******PSSSLGTQTYICNVNHP***
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDEVKFNWYVDGVEVHN***AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE***
YKCKVSNKALPAPIEKTI***SKAKGQPREPQVTLP******PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD***
IAVEWESNGQPENNYKTT***PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL***
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 281)

Humanized 4B10 clone full-length light chain sequence

4B10-K1

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGDIVMTQTPLSLVTPGPQPAISCRSSOSLVHTNGNTYL
HWYI***LQKPGQSPQLIYMVSNRFSGV******PDRFGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCSQ***
SAHVPPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPSDEQLKSGTASVVC***VCLNNFYPREAKVQ***
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 282)

FIG. 110

Humanized 2C3 clone full-length heavy chain nucleic acid sequence

2C3-SFD1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GAGGTACAGCTGCTGGAGTCGGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGTTCTCTGA
GACTCTCTGTGCAGCTTCTGGATTCACTTCAATACTACTGGATGAACCTGGTCC
GCCAGGCTCCAGGAAGGGACTTGGAGTGGGTCAAATTAGATTGAATCTAAT
AATTATGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGGGTCAACCATCTCCAGAGA
TGATTCACAAACAGCCTCTATCTCAAATGAATTCCCTGAAACTGAAGACACTGC
CGTTTATTACTGTACCCCAAGTGACTIONTGGGGCAAGGCACCACTGTACAGTCTC
CTCACGCTCACCAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCTCCAGAGACCTCTG
GGGTACAGCGGGCTGGCTGGCTGCAAGGACTCTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG
TGGAACTCAGGCGCCCTGACAGCGGGCTGCAACCTTCCCGTGTCTACAGTCCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCACCAAGGTGGACAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCTACACATGCCCACCGTCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCCT
CCTCTCCCCCCTAACCCAAAGGACACCCCATGATCTCCGGGACCCCTGAGGTCACTGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGG
AGGTGCAATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGTC
AGCGCTCTCACCCTGCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
AACAAAGCCCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCTAACGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCGGTGACCTGAC
ATGCTCTGGTAAAGGCTTCTATCCGACATCGCCGACATCGCCGTTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCAACCGCCCTCCGCTGGACTCCGACGGCTCCCTCTCCTAC
GCAAGCTCACCGTGGACAGTCACGGTGGCAGCAGGGGAACTGCTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATGA
(SEQ ID NO: 283)

Humanized 2C3 clone full-length light chain nucleic acid sequence

2C3-K12

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GACATTGTGATGACCCAGACTCCACTCAAGTTCAGTTGTCAGTTACCCCTGGACAAACAGC
CTCAATCTCTGCAAGTCAGTCAGACGCCCTTATATACTAATGGAAAAACCTATTT
GAACCTGGTATTACAGAACGCCAGGGCAGTCTCCACAGGCCCTAATCTATCTGGTGT
CTAAATTGGACTCTGGACTCCCTGACAGCTGAGCTGGCAGTGGGATCAGGAACAGAT
TTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGGCTGAGGATGTGGAGTTTATTACTGGT
GCAAGGTACACATCTGCACACGTTCCGTCACGGGACCAAGGGCAGGGTGGAGATAAAAGAA
CTGGGGCAGCACCAAGCGTCTTACCTCCGGCCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGAACTGC
CTCTGTTGTGCTGCTGAAATACTCTATCCGACAGAGGGCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT
AACGCCCTCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTCAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGT
GTTAG (SEQ ID NO: 284)

FIG. 111

Humanized 7F11 clone full-length heavy chain nucleic acid sequence

7F11-SFD1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GAGGTACAGCTGCTGGAGTCGGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGTTCTCTGA
GACTCTCTGTGCAGCTCTGGCTTCACATTACCGACTATTACATGAGCTGGGCC
GCCAGGCTCCAGGAAGGGACTTGAGTGGGTGGGTTCTATAAGGAACAAGGCTAA
CGGTTATACAACCGAGTACAACGCTTCCTTAAAGGGCGGTTCACCATCTCCAGAG
ATGATTCAAACAAACAGCCTCTATCTTCAATGAATTCCCTGAAAAGTAAAGACACTG
CCGTTATTACTGTACCAGGTATATCTTTGATTACTGGGGCCAAGGACCAACTG
TCACAGCTCCTCAGCCCTCACCACGGGCCATCGGTCTCCCTGGAACCCCTCTCAA
GAGCACCTCTGGGGTACAGCGCCCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACGG
TGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGGCCTGGTACCCAGGGCTGCAACCTCTCCGGCTGCTTA
CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGCCCTCAGCAGCTGGGACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAAAGTTGAG
CCCAAAACTCTTGACAAAACCTCACACATGCCAACCGTGGCCACCGTGAACCTCTGGGGGA
CCGTCAGTCITCCCTCTCCCCAAAACCCAAGGGCACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAG
GTCACTGCGTGGGGTGAGCTGAGGACAGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCAATGCCAAGACAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGCTCCTCACCGTGGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCCTCAGGCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGC
AGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCGGGTGAGCTGACCAAGAACAG
GTCACTGCGTGGGGTGACATGCCAACGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGCTGGGAGAG
CAATGGGCAAGGAGAACACTAACAGACCGCCTCCGGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCITCCCTCTACGCAAGCTCACCGTGGCAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAAAGCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCACTGAGGTCTGCACAACACTACACGCAAGAGGACCTCTCCGTCTCCGG
GTAATGA (SEQ ID NO: 285)

Humanized 7F11 clone full-length light chain nucleic acid sequence

7F11-K2

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GATATTGTAATGACCCAAACACCCCTCTCTCTTCACTGACACCTGGACAGCCACCG
TCCATCTCCTGCAGGTCTCACAGACTCTCGTGCACACCAATGGCAATTCTCACCTG
CATGGTACCTGAGAAGCCGGGGAGGAGCCAGTTGCTGATCTATATGGTGTG
TAATCCGGTCTCCGGAGTCCCGGAGAGATTCTGGTTCAAGGGTCTGGAACTGATT
TACACTGAAGATTAGTCGGGTGAGGGCCAGGATGTAGCGTGTATTACTGCTCAC
AAAGCACACATCTGCCGTTCACTTTCGGCAAGGAACAAAGCTCGAAATCAAGCGAA
CTGGGCAGCACAGCGTCTCATCTCCGGCATCTGAGCAGTTGAATCTGGAACTG
CTCTGTTGCTGCTGCTGAATAACTCTATCCAGAGAGGGCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT
AACCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAGCGTGGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCATCAGGGCTGAGCTGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GTTAG (SEQ ID NO: 286)

FIG. 112

Humanized 9D9 clone full-length heavy chain nucleic acid sequences**9D9-H16**

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGAGAG
GTACAGCTCTGAAAGTGGAGGTGGCCTTGTCCAACCCGGAGGGTCATTGCGGTTGAG
CTGTGGCGCAAGTGGCTCACCTCTCTGACGCTTGATGGACTGGGTGAGACAAGCCC
CCGTAAGGGACTGGAGTTGGTTCTGAAATCAGGAACAAGGCCAAGAACATGCAAC
ATATATGCGAAAGTGTGAAGGGAAAGGTCAAAATCAACTAGTAGAGATAACAGCAAGAAC
CACTGTACCTCCAGATGAAACAGCTCAGAGCTGAGGACACCGCCGCTATTATGTACC
ACTCTCGATTCATGGGGCAGGGTACCCACCGTTACAGTCAGCAGCAGCCTCACCACAGGGC
CCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGTACAGCGGCCCCCTGGCTG
CCTGGTCAAGGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGAACTCAGGCCGCCCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCGGCTGCTCACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCG
TGCCCTCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGAACTGAACTACAAGGCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTGTGACAAAATCTGACACATGCCACCCGGTGGCCAGCAC
CTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGCTCTCCCTCTCCCCAAAACCAAGGGACACCCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGGCCAGAAAGACCTGAGGTCAAGTC
AACTGGTACGTGAGGGCTGGCAGGTCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAGCGTGGTGGTGACCCAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGGGCCATCCGGGGATGAGCTGACCAAGAACAG
GGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTACACCCCTGGGGATGAGCTGACCAAGAACAG
GTCAGCCGTACATGCCCTGACAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGCTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGGTGTGACTCCGACGGCTCCITCTCCTC
TACAGCAAGCTACCGTGTGACAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCTCCGGTAAATGA (SEQ
ID NO: 287)

9D9-H18

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGAGAG
GTACAGCTCTGAAAGTGGAGGTGGCCTTGTCCAACCCGGAGGGTCATTGCGGTTGAG
CTGTGGCGCAAGTGGCTCACCTCTCTGACGCTTGATGGACTGGGTGAGACAAGCCC
CCGTAAGGGACTGGAGTTGGTTCTGAAATCAGGAACAAGGCCAAGAACATGCAAC
ATATATGCGAAAGTGTGAAGGGAAAGGTCAAAATCAACTAGTAGAGATAACAGCAAGAAC
CACTGTACCTCCAGATGAAACAGCTCAGAGCTGAGGACACCGCCGCTATTATGTACC
ACTCTCGATTCATGGGGCAGGGTACCCACCGTTACAGTCAGCAGCAGCCTCACCACAGGGC
CCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGTACAGCGGCCCCCTGGCTG
CCTGGTCAAGGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGAACTCAGGCCGCCCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCGGCTGCTCACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCG
TGCCCTCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGAACTGAACTACAAGGCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTGTGACAAAATCTGACACATGCCACCCGGTGGCCAGCAC
CTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGCTCTCCCTCTCCCCAAAACCAAGGGACACCCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGGCCAGAAAGACCTGAGGTCAAGTC
AACTGGTACGTGAGGGCTGGCAGGTCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAGCGTGGTGGTGACCCAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGGGCCATCCGGGGATGAGCTGACCAAGAACAG
GGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTACACCCCTGGGGATGAGCTGACCAAGAACAG
GTCAGCCGTACATGCCCTGGTCAAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGCTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGGTGTGAGCTCCGACGGCTCCITCTCCTC
TACAGCAAGCTACCGTGTGACAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCTCCGGTAAATGA (SEQ
ID NO: 288)

FIG. 113

Humanized 9D9 clone full-length light chain nucleic acid sequence

9D9-K13

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GATATCGTGATGACACAAACTCCCCCTGTCCTCTGTCTGTAACTCCAGGTCAAGCCCCC
GACTATTTCATGTAAGAGCAGCCAATCCCCTGCTGGACAGCGACGGGAAGACCTTACC
TGAACCTGGTTACTCCAAAAGCCAGGACAAAGTCCCCAACGCCCTTATTACCTGGTGT
CACCCCTGGACTCTGGCGTCCCCGATCGATTAGCGGCAGCGGGAGTGGCACAGAT
TTCACCCCTGAAAATATCCCGCGTCGAGGCCAAGATGTGGGCCGTGACTACTGCTG
GCAGGGCACACATTTCCCCCTGGACATTTCGTCAGGGGACAAAGCTGGAAATTAAAC
GAACCTGTGGCAGCACCAAGCGTCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTGAATCTGGAAC
TGCCCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGGCAAAGTACAGTGGAAAGGTG
GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCAAAGAGCTTCAACAGGGAG
AGTGTAG (SEQ ID NO: 289)

FIG. 114

Humanized 12G6 clone full-length heavy chain nucleic acid sequence

12G6-SFD1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GAGGTACAGCTGCTCGAGTCGGCAGGAGGCTTGGTAACGCCCTGGGGTTCTCTGA
GACTCTCTGTGCAGCTCTGGATTCCCATTCACTAAGCTGGATGAACCTGGTCC
GCCAGGCTCCAGGAAGGGACTTGAGTGGTGGGTCAAATTAGATTGAAATCTAAT
AATTATGCAACACATTATGGGAGTCTGTGAAAGGGGGTTCACCATCTCCAGAGA
TGATTCACAAACAGCCTCTATCTTCAATGAATTCCCTAAAGACTGAAGACACTGC
CGTTATTACTGTACCCAATGACTATTGGGCAAGGCACCACTGTACAGCTCTC
CTCAAGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCAGAGACCTCTG
GGGGTACAGCGGGCTGGGCTGGCTGGTAAGGACTCTGGGAGCAGGGTGACGGTGTGCG
TGGAACTCAGCGGGCTGACAGCGGGCTGCAACCTTCCCGTGTCCACAGTCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAAAGTTGAGCCAAATCTTG
TGACAAAAACTCACATGCGCACCGTGAACCTCTGGGGGGACGGTCAGTCIT
CCTCTCCCCCCTAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGGACCCCTGAGGTCACTGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCTGAGGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGCTGCAATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGTGTGTC
AGCGTCTCACCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
AACAAAGCCCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGGCAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGACACCCCTGCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAACGCTGAC
ATGCTCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCAGC
CGGAGAACAACTACAAAGGACACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCCTCTACAG
GCAAGCTCACCGTGGACAGTCAGCTGGAGGAGCAGTGTACAGTGGAGTGGAGTGT
CATGAGGCTCTGACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCCTGGGAAATGA
(SEQ ID NO: 290)

Humanized 12G6 clone full-length light chain nucleic acid sequence

12G6-K12

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTCTCCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GACATTGTGATGACCCAGACTCCACTCAAGTTCTCAGTTACCCCTGGCAACCAAGC
CTCTATCTCTGCAAGTCAGTCAGAGCCCTTATATACTAATGAAAAACCTATTT
GAACTGGGTITTAACAGAACGGCAGGCCAGTCTCCACAGCGCTAATCTATCTGGTGT
CTAAACTGGACTCTGGACTCCCTGACAGGTTCTCTGGCAGTGGATCAGGAACAGAT
TTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGGCTGAGGATGTGGAGTTTAAACTGCGT
GCAAGGTTCACATTTCACACCGTTCGGTCAGGGACCAAGCTGGAGATTAAACGAAC
TGTGGCAGCACCAAGCGTCTCATCTCCCGCCTCTGATGAGCAGITGAATCTGGAACTGCG
TCTGTTGTGCTGCTGTAATAACTCTATCCAGAGAGGGCCAAGTACAGTGGAGGTGGATA
ACGCCCTCAAATCGGGTAACTCCAGGGAGAGTGTACAGAGCAGGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACAGAGAAACAAAGTCTACGCC
TGCAGGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTAACAGGGAGAGTG
TTAG (SEQ ID NO: 291)

FIG. 115

Humanized 4B10 clone full-length heavy chain nucleic acid sequence**4B10-H1**

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTCTCCCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
 GAGCTACAGCTGTCGAGTCCGGAGGAGGCTTCTACAGCCTGGGGTTCTCTGA
 GACTCTCTGTGCAGCTCTGGATTACCTTTCTGATTACTACATGAGCTGGTCC
 GCCAGGCTCAGGAAAGGGACTTGAGTGGTGGGTTTATTAGAAACAAAGCTAAT
 GGTACAAACACAGACTGCACTCTGTGAACGGTCCGTCACCATCTCCAGAGA
 TGATTCACAAACAGCTATACTTCAAATGAATTCCCTGAAAAACTGAAGACACTGC
 CGTTTATTACTGTGAAGATAATCTGGTTGACTACTGGGCCAAGGCCACTGT
 CACAGTCTCCTCAGCCTCACCAGGGCCCACATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCAAAG
 AGCACCTCTGGGGTACAGCGGGCCCTGGGCTGGCTGGTAAGGACTACTTCCCGAACCGGT
 GACGGTGTGIGGAACCTAGGGCGCCCTGACCGAGCGCGTGACACCTTCCGGCTGTCTAC
 AGTCTCAGGACTCTACTCCTCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCAGCAGCTGGGACACC
 AGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC
 CCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCAACCGTGGCCACCCGACACTCTGGGGGAC
 CGTCAGTCTCCTCTGGGGGAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
 TCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTG
 ACGGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTACGCGTCCCTACCGTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
 CAAGGGTCTCCAACAAAGCCCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCA
 GCCCCGAGAACCAAGGTGACACCCCTGCCCTATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAG
 TCAGGCTGACATGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCCAGGACCGCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCTTCT
 TCCTCTACAGCAAGCTACCGTGAGGTGGCAGCAGGGGAAAGTCTCTCATGCT
 CCCGATGATGAGGGCTCTGCACACCAACTACACGCAGAACAGGCTCTCTGCTCTCCGGTA
 AATGA (SEQ ID NO: 292)

Humanized 4B10 clone full-length light chain nucleic acid sequence**4B10-K1**

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTCTCTCCCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
 GACATTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGTCAGTCACTCCGGACAACCCAGCC
 TCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTCACACACTAATGAAACACCTATTA
 CATTGGTACCTGCAAGGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCTGATTATATGGTTCC
 AACCGATTTCTGGGTCCAGCAGGTTCACTGGCATGGGACAGAGATT
 CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGACTTATTACTGCTCTC
 AAAGTGCAACATGTTCTCCGCTCACGTTCCGTCAGGGACCCAGGCTGGAGATTAAA
 CGAACCTGTGGCAGCAGCAAGCGCTTCATCTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
 CTGCTCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCAGAGAGGGCAAAGTACAGTGGAGGT
 GGATAACGCCCTCACTGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACA
 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGGAGAAACAAAGTCT
 ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
 GAGTGTAG (SEQ ID NO: 293)

FIG. 116

RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD52 HUMANA OU PARTE DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTE E SEU USO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO O CODIFICANDO E SEU USO, BEM COMO CADEIA LEVE OU PARTE DESTA DE ANTICORPO, CADEIA PESADA OU PARTE DESTA DE ANTICORPO E CÉLULA HOSPEDEIRA**".

5 **LEVE OU PARTE DESTA DE ANTICORPO, CADEIA PESADA OU PARTE DESTA DE ANTICORPO E CÉLULA HOSPEDEIRA**".

A presente invenção refere-se a imunoglobulinas humanizadas, anticorpos monoclonais de camundongo e anticorpos quiméricos que possuem especificidade de ligação por CD52 humana. A presente invenção refere-se ainda a uma cadeia leve humanizada de imunoglobulina e a uma cadeia pesada humanizada de imunoglobulina. A invenção refere-se também a ácidos nucleicos isolados, vetores recombinantes e células hospedeiras que compreendem uma sequência que codifica uma imunoglobulina humanizada ou cadeia leve ou cadeia pesada de imunoglobulina e a um método para preparar uma imunoglobulina humanizada. As imunoglobulinas humanizadas podem ser usadas em aplicações terapêuticas para tratar, por exemplo, doença autoimune, câncer, linfoma não Hodgkin, esclerose múltipla e leucemia linfocítica crônica.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



FA1996AADF102399

Campo 2



464A94C9E503FD7E

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P179764.TXT
- Data de Geração do Código: 10-11-2011
- Hora de Geração do Código: 16:03:29
- Código de Controle:
 - Campo 1: FA1996AADF102399
 - Campo 2: 464A94C9E503FD7E