



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

(11) PI 0607315-8 B1



(22) Data do Depósito: 07/02/2006

(45) Data de Concessão: 17/05/2022

(54) Título: MOLÉCULA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO ANTI-EGFR HUMANIZADA E SEUS USOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE EGFR EM UMA AMOSTRA

(51) Int.Cl.: C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 07/02/2005 US 60/650,115.

(73) Titular(es): ROCHE GLYCART AG.

(72) Inventor(es): EKKEHARD MÖSSNER; PABLO UMANA.

(86) Pedido PCT: PCT IB2006000238 de 07/02/2006

(87) Publicação PCT: WO 2006/082515 de 10/08/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/08/2007

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, COMPOSIÇÃO, MÉTODO DE PRODUZIR UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO, MOLÉCULA DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO E O USO DA MESMA-, MÉTODO PARA DETECTAR IN VIVO OU IN VITRO A PRESENÇA DE EGFR EM UMA AMOSTRA, CÉLULA HOSPEDEIRA ENGENDRADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E O USO DA MESMA. A presente invenção refere-se às moléculas de ligação de antígeno (ABMs). Em formas de realização particulares, a presente invenção refere-se aos anticorpos monoclonais recombinantes, incluindo anticorpos quiméricos, primatizados ou humanizados específicos para EGFR humano. Além disso, a presente invenção refere-se às moléculas de ácido nucléico que codificam tais ABMs, e vetores e células hospedeiras compreendendo tais moléculas de ácido nucléico. A invenção refere-se ainda aos métodos para produzir as ABMs da invenção, e aos métodos de usar estas ABMs no tratamento da doença. Além disso, a presente invenção refere-se às ABMs com glicosilação modificada tendo propriedades terapêuticas melhoradas, incluindo anticorpos com ligação de receptor de Fc aumentada e função efetora aumentada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MOLÉCULA DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO ANTI-EGFR HUMANIZADA E SEUS USOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE EGFR EM UMA AMOSTRA".

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se às moléculas de ligação de antígeno (ABMs). Em modalidades particulares, a presente invenção refere-se aos anticorpos monoclonais recombinantes, incluindo anticorpos quiméricos, primatizados ou humanizados específicos para receptor do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR). Além disso, a presente invenção refere-se às moléculas de ácido nucléico que codificam tais ABMs, e vetores e células hospedeiras compreendendo tais moléculas de ácido nucléico. A invenção refere-se ainda aos métodos para produzir as ABMs da invenção, e aos métodos de usar estas ABMs no tratamento da doença. Além disso, a presente invenção refere-se às ABMs com glicosilação modificada tendo propriedades terapêuticas melhoradas, incluindo anticorpos com ligação de receptor de Fc aumentada e função efetora aumentada.

Antecedentes da Técnica

EGFR e Anticorpos Anti-EGFR

[002] O receptor do fator de crescimento epidérmico humano (também conhecido como HER-1 ou Erb-B1, e referido aqui como "EGFR") é um receptor de transmembrana de 170 kDa codificado pelo c-erbB protooncogene, e exibe atividade intrínseca de tirosina cinase (Modjtahedi *et al.*, *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996); Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). A entrada de base de dados SwissProt P00533 fornece a sequência de EGFR. Também existem isoformas e variantes de EGFR (por exemplo, transcritos de RNA alternativos, versões truncadas, polimorfismos, etc.) incluindo mas não limitadas àque-

las identificadas pela entrada de base de dados Swissprot números P00533-1, P00533-2, P00533-3, e P00533-4. EGFR é conhecido ligar-se aos ligandos incluindo fator de crescimento epidérmico (EGF), fator- α de crescimento transformante (TGt- α), anfirregulina, EGF de ligação de heparina (hb-EGF), betacelulina, e epirregulina (Herbst ar. Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002); Mendelsohn e Baselga, *Oncogene* 19:6550-6' (2000)). EGFR regula numerosos processos celulares por intermédio de caminhos de transdução mediados por tirosina-cinase, incluindo, mas não limitados a, ativação de caminhos de sinal trans que controlam a proliferação de célula, diferenciação, sobrevivência celular, apoptose, angiogênese, mitogênese, e metástase (Atalay et al., *Ann. Oncology* 14:1346-1363 (2003); Tsao e Herbst, *Signal* 4:4-9 (2003); Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)).

[003] A superexpressão de EGFR foi relatada em numerosas condições malignas humanas, incluindo cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, e rim. (Atalay et al., *Ann. Oncology* 14:1346-1363 (2003); Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)). Em muitas destas condições, a superexpressão de EGFR correlaciona-se ou é associada com o prognóstico deficiente dos pacientes. (Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)). EGFR também é expressado nas células de tecidos normais, particularmente os tecidos epiteliais da pele, fígado, e trato gastrointestinal, embora em níveis geralmente mais baixos do que em células malignas (Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)).

[004] Os anticorpos monoclonais não conjugados (mAbs) podem ser fármacos úteis para o tratamento de câncer, como demonstrado pela U.S. Food and Drug Administration's approval of Trastuzumab (Herceptin®; Genentech Inc) para o tratamento de câncer de mama

avançado (Grillo-Lopez, A.-J., *et al.*, *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)), Rituximab (Rituxan®; DEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, e Genentech Inc., San Francisco, CA), para o tratamento de linfoma que não de Hodgkin de grau baixo ou folicular, de célula B positiva de CD20, Gemtuzumab (Mylotarg®, Celltech/Wyeth-Ayerst) para o tratamento de leucemia mielóide aguda reincidente, e Alemtuzumab (CAMPATH®, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para o tratamento de leucemia linfocítica crônica de célula B. O sucesso destes produtos conta não apenas com sua eficácia mas também com seus perfis de segurança proeminentes (Grillo-Lopez, A. J., *et al.*, *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)). Apesar dos sucessos destes fármacos, existe correntemente um interesse grande em obter atividade de anticorpo específica mais alta do que aquela que é tipicamente fornecida por terapia de mAb não conjugada.

[005] Os resultados de vários estudos sugerem que os mecanismos dependentes do receptor de Fc contribuem substancialmente para a ação de anticorpos citotóxicos contra tumores e indicam que um anticorpo ideal contra tumores ligaria-se preferencialmente aos receptores de Fc de ativação e minimamente ao parceiro inibitório Fc γ RIIB. (Clynes, R. A., *et al.*, *Nature Medicine* 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M., e Ravetch, J. V., *Exp. Med.* 195(12):1653-1659 (Junho de 2002). Por exemplo, os resultados de pelo menos um estudo sugerem que o polimorfismo no receptor de Fc γ RIIIa, em particular, é fortemente associado com a eficácia da terapia de anticorpo. (Cartron, G., *et al.*, *Blood* 99(3):754-757 (Fevereiro de 2002)). Este estudo mostrou que os pacientes homozigóticos para Fc γ RIIIa têm uma resposta melhor a Rituximab do que os pacientes heterozigóticos. Os autores concluíram que a resposta superior foi devido a melhor ligação *in vivo* do anticorpo a Fc γ RIIIa, que resultou em melhor atividade de ADCC

contra células de linfoma. (Cartron, G., et al., *Blood* 99(3):754-757 (Fevereiro de 2002)).

[006] Várias estratégias para alvejar EGFR e bloquear caminhos de sinalização de EGFR foram relatadas. Inibidores de tirosina cinase de molécula pequena como gefitinib, erlotinib, e CI-1033 bloqueiam a autofosforilação de EGFR na região de tirosina cinase intracelular, inibindo deste modo eventos de sinalização a jusante (Tsao e Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)). Os anticorpos monoclonais, por outro lado, alvejam a porção extracelular de EGFR, que resulta em bloqueio da ligação de ligando e deste modo inibe eventos a jusante tais como proliferação de célula (Tsao e Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)).

[007] Vários anticorpos monoclonais de murino foram gerados os quais obtêm um tal bloqueio *in vitro* e que foram avaliados quanto à sua capacidade para afetar o crescimento de tumor em modelos de xenoenxerto de camundongo (Masui, et al., *Cancer Res.* 46:5592-5598 (1986); Masui, et al., *Cancer Res.* 44:1002-1007 (1984); Goldstein, et al., *Clin. Cancer Res.* 1: 1311-1318 (1995)). Por exemplo, EMD 55900 (EMD Pharmaceuticals) é um anticorpo monoclonal anti-EGFR de murino que foi incitado contra linhagem de célula de carcinoma epidermóide humana A431 e foi testado em estudos clínicos de pacientes com carcinoma de célula escamosa avançado da laringe ou hipofaringe (Bier et al., *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 252:433-9 (1995)). Além disso, os anticorpos monoclonais de rato ICR16, ICR62, e ICR80, que ligam-se ao domínio extracelular de EGFR, mostraram ser eficazes em inibir a ligação de EGF e TGF- α ao receptor. (Modjtahedi et al., *Int. J. Cancer* 75:310-316 (1998)). O anticorpo monoclonal de murino 425 é um outro MAb que foi incitado contra a linhagem de célula de carcinoma A431 humana e foi descoberto ligar-se a um epitopo de polipeptídeo no domínio externo do receptor do fator de crescimento epidérmico humano. (Murthy et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 252(2):549-560

(1987). Um problema potencial com o uso de anticorpos de murino em tratamentos terapêuticos é que anticorpos monoclonais não humanos podem ser reconhecidos pelo hospedeiro humano como uma proteína estranha; portanto, injeções repetidas de tais anticorpos estranhos podem levar à indução de respostas imunes levando a reações de hiper-sensibilidade prejudiciais. Para anticorpos monoclonais com base em murino, isto é frequentemente referido como uma resposta de Anticorpo Anticamundongo Humano, ou resposta "HAMA", ou um Anticorpo Anti-Rato Humano, ou resposta "HARA". Adicionalmente, estes anticorpos "estranhos" podem ser ligados pelo sistema imune do hospedeiro tal que eles são, de fato, neutralizados antes que eles alcancem seu sítio alvo. Além disso, os anticorpos monoclonais não humanos (por exemplo, anticorpos monoclonais de murino) tipicamente carecem de funcionalidade efetora humana, isto é, eles são incapazes, *inter alia*, para mediar a lise dependente de complemento ou lisam células alvo humanas através da toxicidade celular dependente de anticorpo ou fagocitose mediada por receptor de Fc.

[008] Os anticorpos quiméricos compreendendo porções de anticorpos de duas ou mais espécies diferentes (por exemplo, camundongo e ser humano) foram desenvolvidos como uma alternativa para anticorpos "conjugados". Por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.891.996 (Mateo de Acosta del Rio *et al.*) debate um anticorpo químérico de camundongo/humano, R3, direcionado contra EGFR, e a Pat. U.S. Nº 5.558.864 debate a geração de formas químéricas e humanizadas do MAb 425 anti-EGFR de murino. Também, IMC-C225 (Erbilux®; ImClone) é um anticorpo monoclonal anti-EGFR de camundongo/humano químérico (com base em anticorpo monoclonal M225 de camundongo, que resultou em respostas de HAMA em experiências clínicas humanas) que foi relatado demonstrar eficácia antitumor em várias modelos de xenoenxerto humano. (Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). A eficácia

de IMC-C225 foi atribuída a vários mecanismos, incluindo inibição de eventos celulares regulados por caminhos de sinalização de EGFR, e possivelmente por atividade de toxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) aumentada (Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). IMC-C225 também foi usado em experiências clínicas, incluindo em combinação com radioterapia e quimioterapia (Herbst e Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). Recentemente, Abgenix, Inc. (Fremont, CA) desenvolveu ABX-EGF para a terapia do câncer. ABX-EGF é um anticorpo monoclonal anti-EGFR completamente humano. (Yang *et al.*, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 38: 17-23 (2001)).

Glicosilação de Anticorpo

[009] O componente de oligossacarídeo pode afetar significantemente as propriedades relevantes à eficácia de uma glicoproteína terapêutica, incluindo estabilidade física, resistência ao ataque de protease, interações com o sistema imune, farmacocinética, e atividade biológica específica. Tais propriedades podem depender não apenas da presença ou ausência, mas também das estruturas específicas, de oligossacarídeos. Algumas generalizações entre estrutura de oligossacarídeo e função de glicoproteína podem ser feitas. Por exemplo, certas estruturas de oligossacarídeo medeiam a liberação rápida da glicoproteína da corrente sanguínea através de interações com proteínas de ligação de carboidrato específicas, enquanto outras podem ser ligadas por anticorpos e provocam reações imunes indesejadas. (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

[010] As células mamíferas são os hospedeiros preferidos para a produção de glicoproteínas terapêuticas, devido à sua capacidade para glicosilar proteínas na forma mais compatível para a aplicação humana. (Cumming *et al.*, *Glycobiology* 1:115-30 (1991); Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)). As bactérias muito raramente glicosilam proteínas, e outros tipos semelhantes de hospedeiros co-

mons, tais como leveduras, fungos filamentosos, células de inseto e planta, produzem padrões de glicosilação associados com a liberação rápida da corrente sanguínea, interações imunes indesejáveis, e em alguns casos específicos, atividade biológica reduzida. Entre as células mamíferas, células do ovário de hamster Chinês (CHO) foram o mais comumente usadas durante as últimas duas décadas. Além de fornecer padrões de glicosilação adequados, estas células permitem a geração consistente de linhagens de célula clonal geneticamente estáveis, altamente produtivas. Elas podem ser cultivadas a densidades altas em biorreatores simples usando meios isentos de soro, e permitem o desenvolvimento de bioprocessos seguros e reproduzíveis. Outras células animais comumente usadas incluem células do rim de fígado de hamster (BHK), células de mieloma de camundongo NS0 e SP2/0. Mais recentemente, a produção de animais transgênicos também foi testada. (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

[011] Todos os anticorpos contêm estruturas de carboidrato em posições conservadas nas regiões constantes de cadeia pesada, com cada isótipo possuindo um arranjo separado de estruturas de carboidrato ligadas a N, que variavelmente afetam a montagem, secreção ou atividade funcional de proteína. (Wright, A., e Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). A estrutura do carboidrato ligado a N anexo varia consideravelmente, dependendo do grau de processamento, e pode incluir oligossacarídeos complexos de alto teor de manose, ramificado multiplicado assim como biantenários. (Wright, A., e Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Tipicamente, existe processamento heterogêneo da estrutura do núcleo de oligossacarídeos ligados em um sítio de glicosilação particular tal que mesmo os anticorpos monoclonais existem como glicoformas múltiplas. Do mesmo modo, foi mostrado que diferenças maiores na glicosilação de anticorpo ocorrem entre linhagens de célula, e ainda diferenças menores são observadas

para uma linhagem de célula dada cultivada sob condições de cultura diferentes. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5(8):813-22 (1995)).

[012] Um modo para obter aumentos grandes na potência, enquanto mantendo um processo de produção simples e evitando potencialmente efeitos colaterais significantes, indesejáveis, é realçar as funções efetoras naturais, mediadas por célula de anticorpos monoclonais engendrando-se seu componente de oligossacarídeo como descrito em Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) e Pat. U.S. Nº 6.602.684, os conteúdos das quais são por meio desta incorporados por referência em sua totalidade. Os anticorpos tipo IgG1, os anticorpos mais comumente usados na imunoterapia do câncer, são glicoproteínas que têm um sítio de glicosilação ligado a N conservado em Asn297 em cada domínio de CH2. Os dois oligossacarídeos biantenários complexos ligados a Asn297 são enterrados entre os domínios de CH2, formando contatos extensivos com a cadeia principal de polipeptídeo, e sua presença é essencial para que o antícorpo medie funções efetoras tais como citotoxicidade celular dependente de antícorpo (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. e Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

[013] Umaña et al. mostraram previamente que a superexpressão em células do ovário de hamster Chinês (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminiltransferase III ("GnTIII"), uma glicosiltransferase que catalisa a formação de oligossacarídeos bifurcados,显著mente aumenta a atividade de ADCC *in vitro* de um antícorpo monoclonal químérico antineuroblastoma (chCE7) produzido pelas células CHO engendradas. (Ver Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999); e Publicação Internacional Nº WO 99/54342, os conteúdos inteiros das quais são por meio desta incorporados por referência). O antícorpo chCE7 pertence a uma classe grande de mAbs não conju-

gados que têm afinidade e especificidade de tumor altas, mas têm muito pouca potência para ser clinicamente útil quando produzido em linhagens de célula industriais padrão que carecem da enzima GnTIII (Umaña, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Este estudo foi o primeiro a mostrar que aumentos grandes da atividade de ADCC podem ser obtidos engendrando-se as células que produzem anticorpo para expressar GnTIII, que também levou a um aumento na proporção de oligossacarídeos bifurcados, associados a (Fc) de região constante, incluindo oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados, acima dos níveis encontrados em anticorpos que ocorrem naturalmente.

[014] Permanece uma necessidade para métodos terapêuticos realçados que alvejam EGFR para o tratamento de distúrbios de proliferação de célula em primatas, incluindo, mas não limitados a, seres humanos, em que tais distúrbios são caracterizados por expressão de EGFR, particularmente expressão anormal (por exemplo, superexpressão) incluindo, mas não limitados a, cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, e rim.

Breve Sumário da Invenção

[015] Reconhecendo o potencial terapêutico tremendo de moléculas de ligação de antígeno (ABMs) que têm a especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato (por exemplo, ligam-se ao mesmo epitopo) e que foram glicoengendrados para realçar a afinidade de ligação do receptor de Fc e função efetora, os presentes inventores desenvolveram um método para produzir tais ABMs. *Inter alia*, este método envolve produzir anticorpos quiméricos, recombinantes ou fragmentos quiméricos destes. A eficácia destas ABMs é realçada ainda engendrando-se o perfil de glicosilação da região Fc de anticorpo.

[016] Consequentemente, em um aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo: (a) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO:

56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 122, e SEQ ID NO: 124; (b) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, e SEQ ID NO: 126; e (c) SEQ ID NO: 108. Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo (a) uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 112 e SEQ ID NO: 114; (b) uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 116 e SEQ ID NO: 118; e (c) SEQ ID NO: 119. Em uma modalidade, qualquer um destes polinucleotídeos codifica um polipeptídeo de fusão.

[017] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 2; SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 12; SEQ ID No: 14; SEQ ID No: 16; SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 22; SEQ ID No: 24; SEQ ID No: 26; SEQ ID No: 28; SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40 e SEQ ID No: 120. Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 50; e SEQ ID No: 52. Em uma modalidade, tais polinucleotídeos codificam polipeptídeos de fusão.

[018] A invenção é direcionada ainda a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência tendo pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, ou 99 % de identidade para uma sequência selecionada do

grupo consistindo em SEQ ID No: 2; SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 10; SEQ ID No: 12; SEQ ID No: 14; SEQ ID No: 16; SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 22; SEQ ID No: 24; SEQ ID No: 26; SEQ ID No: 28; SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40 e SEQ ID No: 120, em que o dito polinucleotídeo isolado codifica um polipeptídeo de fusão. Em um aspecto adicional, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade para uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 50; e SEQ ID No: 52, em que o dito polinucleotídeo isolado codifica um polipeptídeo de fusão.

[019] A invenção também é direcionada a um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo quimérico tendo a sequência da SEQ ID No: 1. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência da SEQ ID No: 1; e uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de uma região Fc de anticorpo, ou um fragmento desta, de uma espécie outra que não rato. A invenção também é direcionada a um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo quimérico tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 25; SEQ ID No: 27; SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; e SEQ ID No: 121. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No:

21; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 25; SEQ ID No: 27; SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; e SEQ ID No: 121; e uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de uma região Fc de anticorpo, ou um fragmento desta, de uma espécie outra que não rato.

[020] Ainda em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo quimérico tendo a sequência da SEQ ID No: 43. Em uma modalidade, o polinucleotídeo comprehende uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência da SEQ ID No: 43; e uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de uma região Fc de anticorpo, ou um fragmento desta, de uma espécie outra que não rato. Ainda em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo quimérico tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 49; e SEQ ID No: 51. Em uma modalidade, o polinucleotídeo comprehende uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 49; e SEQ ID No: 51, e uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de uma região constante de cadeia leve de anticorpo (CL), ou um fragmento desta, de uma espécie outra que não rato.

[021] A invenção também é direcionada a um polinucleotídeo isolado comprehendendo uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a região VH do anticorpo ICR62, ou variantes funcionais deste, e uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de uma região Fc de anticorpo, ou um fragmento desta, de uma espécie outra que não rato. Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado comprehendendo uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a região VL do anticorpo ICR62, ou variantes funcionais deste, e uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo

a sequência de uma região CL de anticorpo, ou um fragmento desta, de uma espécie outra que não rato.

[022] A invenção é direcionada ainda a um vetor de expressão compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos isolados descritos acima, e a uma célula hospedeira que compreende um tal vetor de expressão. Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a uma célula hospedeira compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos isolados descritos acima.

[023] Em um aspecto, a invenção é direcionada a um polipeptídeo isolado compreendendo: (a) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 53 SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 123, e SEQ ID NO: 125; (b) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, e SEQ ID NO: 127; e (c) SEQ ID NO: 107, em que o dito polipeptídeo é um polipeptídeo de fusão. Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um polipeptídeo isolado compreendendo (a) uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 111 e SEQ ID NO: 113; (b) SEQ ID NO: 115; e (c) SEQ ID NO: 117, em que o dito polipeptídeo é um polipeptídeo de fusão.

[024] A invenção também é direcionada a um polipeptídeo quimérico compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 1 ou uma variante desta. A invenção é direcionada ainda a um polipeptídeo quimérico compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 43 ou uma variante desta. Em uma modalidade, qualquer um destes polipeptídeos compreende ainda uma região Fc humana e/ou uma região CL humana. A in-

venção também é direcionada a um polipeptídeo quimérico compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 25; SEQ ID No: 27; SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; e SEQ ID No: 121, ou uma variante destas. A invenção é direcionada ainda a um polipeptídeo quimérico compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 49; e SEQ ID No: 51, ou uma variante destas. Em uma modalidade, qualquer um destes polipeptídeos compreende ainda uma região Fc humana e/ou uma região CL humana. Em uma modalidade, a região Fc humana compreende IgG1.

[025] Em um outro aspecto a invenção é direcionada a um polipeptídeo compreendendo uma sequência derivada do anticorpo ICR62 e uma sequência derivada de um polipeptídeo heterólogo e a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo um tal polipeptídeo. Em uma modalidade a molécula de ligação de antígeno é um anticorpo. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é quimérico. Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo é humanizado ou primatizado.

[026] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a uma ABM, que é capaz de competir com o anticorpo ICR62 de rato pela ligação a EGFR e que é quimérica. Em uma modalidade, a ABM é um anticorpo ou um fragmento deste. Em uma outra modalidade, a ABM é um anticorpo recombinante compreendendo uma região VH tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 1; SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 25; SEQ ID No: 27; SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No33; SEQ ID No: 35;

SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; e SEQ ID No: 121. Em uma outra modalidade, a ABM é um anticorpo recombinante compreendendo uma região VL tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 43, SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 49; e SEQ ID No: 51. Em uma outra modalidade a ABM é um anticorpo recombinante que é primatizado. Ainda em uma outra modalidade a ABM é um anticorpo recombinante que é humanizado. Em uma outra modalidade, a ABM é um anticorpo recombinante compreendendo uma região Fc humana. Em uma outra modalidade, qualquer uma das ABMs debatidas acima pode ser conjugada a uma porção tal como uma toxina ou um radiorrótulo.

[027] A invenção é relacionada ainda a uma ABM da presente invenção, a dita ABM tendo oligossacarídeos modificados. Em uma modalidade os oligossacarídeos modificados têm fucosilação reduzida quando comparados aos oligossacarídeos não modificados. Em outras modalidades, os oligossacarídeos modificados são híbridos ou complexos. Em uma outra modalidade, a ABM tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos não fucosilados ou oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados na região Fc da dita molécula. Em uma modalidade, os oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados são híbridos. Em uma outra modalidade, os oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados são complexos. Em uma única modalidade, pelo menos 20 % dos oligossacarídeos na região Fc do dito polipeptídeo são não fucosilados ou bifurcados, não fucosilados. Em modalidades mais preferidas, pelo menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % ou 75 % ou mais dos oligossacarídeos são não fucosilados ou bifurcados, não fucosilados.

[028] A invenção é relacionada ainda a um polinucleotídeo que codifica qualquer uma das ABMs debatidas acima, e para vetores de expressão e células compreendendo um tal polinucleotídeo.

[029] A invenção é relacionada ainda a um método de produzir uma ABM, que é capaz de competir com o anticorpo ICR62 de rato pela ligação a EGFR e em que a dita ABM é quimérica; o dito método compreendendo: (a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma ABM da presente invenção em um meio sob condições que permitem a expressão do dito polinucleotídeo que codifica a dita ABM; e (b) recuperar a dita ABM da cultura resultante.

[030] Em um outro aspecto, a invenção é relacionada a uma composição farmacêutica compreendendo a ABM da invenção. É considerado que a composição farmacêutica pode compreender ainda um veículo farmaceuticamente aceitável, um adjuvante ou uma combinação destes.

[031] Em um outro aspecto, a invenção é relacionada a um método de tratar uma doença caracterizada por expressão de EGFR (por exemplo, anormal ou superexpressão de EGFR). O método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da ABM da presente invenção a um paciente, preferivelmente um paciente mamífero, e mais preferivelmente um ser humano em necessidade deste. Em uma modalidade preferida, a doença é tratada administrando-se uma ABM que é um anticorpo quimérico (por exemplo humanizado), ou um fragmento quimérico de um anticorpo. Em uma modalidade, a ABM é administrada em uma quantidade de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 15,0 mg/kg. Em uma outra modalidade, a ABM é administrada em uma quantidade de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 12,0 mg/kg. Em uma outra modalidade, a ABM é administrada em uma quantidade de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, a ABM é administrada em uma quantidade de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 12,0 mg/kg. Em uma outra modalidade, a ABM é administrada em uma quantidade selecionada do grupo consistindo em cerca de

1,5, cerca de 4,5, e cerca de 12,0 mg/kg.

[032] Ainda em um outro aspecto, a invenção é relacionada a uma célula hospedeira engendrada para expressar pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII em uma quantidade suficiente para modificar os oligossacarídeos na região Fc da ABM produzida pela célula hospedeira, em que a ABM é capaz de competir com o anticorpo ICR62 de rato pela ligação a EGFR e em que a ABM é quimérica. Em uma modalidade, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão. Em uma outra modalidade, a ABM produzida pela célula hospedeira é um anticorpo ou um fragmento de anticorpo. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é humanizado. Em uma outra modalidade, a ABM compreende uma região equivalente à região Fc de uma IgG humana.

[033] A invenção também é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) região determinante de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou uma variante ou forma truncada desta contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para a dita região determinante de complementaridade, em que o dito polinucleotídeo isolado codifica um polipeptídeo de fusão. Preferivelmente, tais polinucleotídeos isolados codificam um polipeptídeo de fusão que é uma molécula de ligação de antígeno. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende três regiões determinantes de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou variantes ou formas truncadas destas contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para cada uma das ditas três regiões determinantes de complementaridade. Em uma outra modalidade, o polinucleotídeo codifica a região variável inteira da cadeia leve ou pesada de um anticorpo quimérico (por exemplo, humanizado). A invenção é direcionada

ainda aos polipeptídeos codificados por tais polinucleotídeos.

[034] Em uma outra modalidade, a invenção é direcionada a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) região determinante de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou uma variante ou forma truncada deste contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para a dita região determinante de complementaridade, e compreendendo uma sequência derivada de um polipeptídeo heterólogo. Em uma modalidade, a molécula de ligação de antígeno compreende três regiões determinantes de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou variantes ou formas truncadas deste contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para cada uma das ditas três regiões determinantes de complementaridade. Em um outro aspecto, a molécula de ligação de antígeno compreende a região variável de uma cadeia leve ou pesada de anticorpo. Em uma modalidade particularmente útil, a molécula de ligação de antígeno é um anticorpo quimérico, por exemplo, humanizado. A invenção também é direcionada aos métodos de fabricar tais moléculas de ligação de antígeno, e o uso das mesmas no tratamento de doença, incluindo malignidades tais como cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, pele, e rim.

[035] A célula hospedeira da presente invenção pode ser selecionada do grupo que inclui, mas é não limitada a, uma célula HEK293-EBNA, uma célula CHO, uma célula BHK, uma célula NSO, uma célula SP2/0, uma célula de mieloma YO, uma célula de mieloma de camundongo P3X63, uma célula PER, uma célula PER.C6 ou uma célula de hibridoma. Em uma modalidade, a célula hospedeira da invenção compreende ainda um polinucleotídeo transfectado compreendendo um polinucleotídeo que codifica a região VL do anticorpo ICR62 de ra-

to ou variantes deste e uma sequência que codifica uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina humana. Em uma outra modalidade, a célula hospedeira da invenção compreende ainda um polinucleotídeo transfectado compreendendo um polinucleotídeo que codifica a região VH do anticorpo ICR62 de rato ou variantes deste e uma sequência que codifica uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina humana.

[036] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a uma célula hospedeira que produz uma ABM que exibe afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada e/ou função efetora aumentada como um resultado da modificação de seus oligossacarídeos. Em uma modalidade, a afinidade de ligação aumentada é a um receptor de Fc, particularmente, o receptor Fc_γRIIIA. A função efetora considerada aqui pode ser selecionada do grupo que inclui, mas é não limitado a, citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada; ligação aumentada a células NK; ligação aumentada a macrófagos; ligação aumentada a células polimorfonucleares; ligação aumentada a monócitos; apoptose de indução de sinalização direta aumentada; maturação de célula dendrítica aumentada; e imprimação de célula T aumentada.

[037] Em uma outra modalidade, a célula hospedeira da presente invenção compreende pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII que é operavelmente ligado a um elemento promotor constitutivo.

[038] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um método para produzir uma ABM em uma célula hospedeira, compreendendo: (a) cultivar uma célula hospedeira engendrada para expressar pelo menos um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de fusão tendo atividade de GnTIII sob condições que permitem a produção da dita ABM e que permitem a modificação dos oligossacarídeos presentes na região Fc da dita ABM; e (b) isolar a dita ABM; em que a dita

ABM é capaz de competir com o anticorpo ICR62 de rato pela ligação a EGFR e em que a dita ABM é quimérica (por exemplo, humanizada). Em uma modalidade, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão, preferivelmente compreendendo o domínio catalítico de GnTIII e o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo selecionado do grupo consistindo no domínio de localização de manosidase II, o domínio de localização de $\beta(1,2)$ -N-acetilglicosaminiltransferase I ("GnTI"), o domínio de localização de manosidase I, o domínio de localização de $\beta(1,2)$ -N-acetilglicosaminiltransferase II ("GnTII"), e o domínio de localização de fucosiltransferase de núcleo $\alpha 1\text{-}6$. Preferivelmente, o domínio de localização de Golgi é de manosidase II ou GnTI.

[039] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um método para modificar o perfil de glicosilação de uma ABM anti-EGFR produzida por uma célula hospedeira compreendendo introduzir na célula hospedeira pelo menos um ácido nucléico ou vetor de expressão da invenção. Em uma modalidade, a ABM é um anticorpo ou um fragmento deste; preferivelmente compreendendo a região Fc de uma IgG. Alternativamente, o polipeptídeo é uma proteína de fusão que inclui uma região equivalente à região Fc de uma IgG humana.

[040] Em um aspecto, a invenção é relacionada a um anticorpo quimérico, recombinante, ou um fragmento deste, capaz de competir com o anticorpo ICR62 de rato pela ligação a EGFR e tendo fucosilação reduzida.

[041] Em um outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de modificar a glicosilação do anticorpo recombinante ou um fragmento deste da invenção usando-se um polipeptídeo de fusão tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo. Em uma modalidade, os polipeptídeos de fusão da invenção compreendem o

domínio catalítico de GnTIII. Em uma outra modalidade, o domínio de localização de Golgi é selecionado do grupo consistindo em: o domínio de localização de manosidase II, o domínio de localização de GnTI, o domínio de localização de manosidase I, o domínio de localização de GnTII e o domínio de localização de fucosiltransferase de núcleo α 1-6. Preferivelmente, o domínio de localização de Golgi é de manosidase II ou GnTI.

[042] Em uma modalidade, o método da invenção é direcionado para produzir um anticorpo quimérico, recombinante ou um fragmento deste, com oligossacarídeos modificados em que os ditos oligossacarídeos modificados têm fucosilação reduzida quando comparados aos oligossacarídeos não modificados. De acordo com a presente invenção, estes oligossacarídeos modificados podem ser híbridos ou complexos. Em uma outra modalidade, o método da invenção é direcionado para produzir um anticorpo recombinante, quimérico (por exemplo, humanizado) ou um fragmento deste tendo uma proporção aumentada de oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados na região Fc do dito polipeptídeo. Em uma modalidade, os oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados são híbridos. Em uma outra modalidade, os oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados são complexos. Em uma outra modalidade, o método da invenção é direcionado para produzir um anticorpo quimérico, recombinante ou um fragmento deste tendo pelo menos 20 % dos oligossacarídeos na região Fc do dito polipeptídeo que são bifurcados, não fucosilados. Em uma modalidade preferida, pelo menos 30 % dos oligossacarídeos na região Fc do dito polipeptídeo são bifurcados, não fucosilados. Em uma outra modalidade preferida, em que pelo menos 35 % dos oligossacarídeos na região Fc do dito polipeptídeo são bifurcados, não fucosilados.

[043] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um anticorpo quimérico, recombinante ou um fragmento deste, que exibe afi-

nidade de ligação do receptor de Fc aumentada e/ou função efetora aumentada como um resultado da modificação de seus oligossacáridos. Em uma modalidade, a afinidade de ligação aumentada é para um receptor de ativação de Fc. Em uma outra modalidade, o receptor de Fc é o receptor de ativação de $Fc\gamma$, particularmente, o receptor de $Fc\gamma$ RIIA. A função efetora considerada aqui pode ser selecionada do grupo que inclui, mas é não limitado a, citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada; ligação aumentada a células NK; ligação aumentada a macrófagos; ligação aumentada a células polimorfonucleares; ligação aumentada a monócitos; apoptose de indução de sinalização direta aumentada; maturação de célula dendrítica aumentada; e impração de célula T aumentada.

[044] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um fragmento de anticorpo recombinante, quimérico (por exemplo, humanizado), tendo a especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato e contendo a região Fc, que é engendrada para ter função efetora aumentada produzida por qualquer um dos métodos da presente invenção.

[045] Em um outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma proteína de fusão que inclui um polipeptídeo tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 1; SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 25; SEQ ID No: 27; SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; e SEQ ID No: 121, e uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina e engendrada para ter função efetora aumentada produzida por qualquer um dos métodos da presente invenção.

[046] Em um outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma proteína de fusão que inclui um polipeptídeo tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 43, SEQ ID No: 45;

SEQ ID No: 49; e SEQ ID No: 51 e uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina e engendrada para ter função efetora aumentada produzida por qualquer um dos métodos da presente invenção.

[047] Em um aspecto, a presente invenção é direcionada a uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo recombinante, quimérico (por exemplo, humanizado), produzido por qualquer um dos métodos da presente invenção, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em um outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma composição farmacêutica compreendendo um fragmento de anticorpo recombinante, quimérico (por exemplo, humanizado) produzido por qualquer um dos métodos da presente invenção, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em um outro aspecto, a presente invenção é direcionada a uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão produzido por qualquer um dos métodos da presente invenção, e veículo farmaceuticamente aceitável.

[048] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um método para alvejar células que expressam EGFR *in vivo* ou *in vitro*. Em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a um método para alvejar células que expressam EGFR em um paciente compreendendo administrar ao paciente uma composição compreendendo uma ABM da invenção.

[049] Ainda em um outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método para detectar *in vivo* ou *in vitro* a presença de EGFR em uma amostra, por exemplo, para diagnosticar um distúrbio relacionado à expressão de EGFR. Em uma modalidade, a detecção é realizada contatando-se uma amostra a ser testada, opcionalmente com uma amostra de controle, com uma ABM da presente invenção, sob condições que levam em consideração a formação de um complexo entre a ABM e EGFR. A formação do complexo depois é detectada (por exemplo, por ELISA ou outros métodos conhecidos na técnica).

Quando do uso de uma amostra de controle com a amostra de teste, qualquer diferença estatisticamente significante na formação de complexos de ABM-EGFR quando comparando as amostras de teste e controle é indicativo da presença de EGFR na amostra de teste.

[050] A invenção é direcionada ainda a um método de tratar um distúrbio relacionado à expressão de EGFR, em particular, um distúrbio de proliferação de célula em que EGFR é expressado, e mais particularmente, em que EGFR é anormalmente expressado (por exemplo superexpressado), incluindo cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, pele, e rim compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo recombinante, quimérico (por exemplo, humanizado) ou fragmento deste, produzido por qualquer um dos métodos da presente invenção, a um paciente humano em necessidade deste.

Breve Descrição das Figuras

[051] A figura 1 mostra a atividade funcional de cadeias de polipeptídeo ICR62 de rato-humano quimérico pesadas e leves individuais quando combinada com as constructos de ICR62 humanizado I-HHC (cadeia pesada) e I-KB (cadeia leve). rVL representa a cadeia leve quimérica, e rVH representa a cadeia pesada quimérica. A designação "r" indica que os domínios variáveis são do anticorpo original de rato.

[052] A figura 2 mostra a atividade de ligação de anticorpos ICR62 humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HHC, I-HHA e I-HLA e constructos da região variável de cadeia leve humanizadas I-KA e I-KB emparelhadas em várias configurações.

[053] A figura 3 mostra atividade de ligação de anticorpos ICR62 humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HLB, I-HLC e I-HLA e constructos da região variável de cadeia leve humanizadas I-KA e I-KC emparelhadas em várias configurações.

[054] A figura 4 mostra atividade de ligação de anticorpos ICR62 humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HLA2, I-HLA3 e I-HLA4 e constructo da região variável de cadeia leve humanizada I-KC quando comparados ao anticorpo ICR62 de rato-humano quimérico.

[055] A figura 5 mostra atividade de ligação de anticorpos ICR62 humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HLA1, I-HLA3, I-HLA5 e I-HLA6 e constructo da região variável de cadeia leve humanizada I-KC quando comparados ao anticorpo ICR62 de rato-humano quimérico.

[056] A figura 6 mostra atividade de ligação de anticorpos ICR62 humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HLA7, I-HLA6, e I-HHB e constructo da região variável de cadeia leve humanizada I-KC quando comparados ao anticorpo ICR62 de rato-humano quimérico.

[057] A figura 7 mostra atividade de ligação de anticorpos ICR62 humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HHF, I-HLA9, e I-HLA8 e constructo da região variável de cadeia leve humanizada I-KC quando comparados ao anticorpo ICR62 de rato-humano quimérico.

[058] A figura 8 mostra atividade de ligação de anticorpos humanizados compreendendo constructos da região variável de cadeia pesada I-HHB, I-HHD, I-HHG, I-HHF, I-HLA7, e I-HLA9 e constructo da região variável de cadeia leve humanizada I-KC.

[059] A figura 9 mostra uma comparação de citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) para várias glicoformas do anticorpo ICR62 quimérico, assim como para a variante humanizada I-HLA4. "G1" refere-se à glicoengenharia do anticorpo por co-expressão com GnTIII. "G2" refere-se à glicoengenharia do anticorpo por co-expressão com GnTIII e ManII. "WT" refere-se aos anticorpos que não foram gli-

coengendrados. Os constructos de cadeia pesada humanizados foram emparelhados com o constructo de cadeia leve I-KC.

[060] A figura 10 mostra uma comparação de ADCC para a forma não glicoengendrada (WT) e a glicoforma G2 (isto é, glicoengendrada por co-expressão com GnTIII e ManII) dos constructos de anticorpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Os mesmos anticorpos foram aplicados a duas linhagens de célula alvo diferentes: no Painel A, a linhagem de célula alvo LN229 foi usada; no Painel B, a linhagem de célula A431 foi usada. Os constructos de cadeia pesada humanizados foram emparelhados com o constructo de cadeia leve I-KC.

[061] As figuras 11A e 11B mostram uma comparação de ADCC para as formas não glicoengendradas (WT) e glicoformas G2 de ICR62 quimérico e os constructos de anticorpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. A linhagem de célula alvo A431 foi usada. Os constructos de cadeia pesada humanizados foram emparelhados com ao constructo de cadeia leve I-KC.

[062] A figura 12 mostra uma comparação de 72h ADCC para glicoformas G2 de ICR62 quimérico e os constructos de anticorpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Os constructos de cadeia pesada humanizados foram emparelhados com ao constructo de cadeia leve I-KC.

[063] A figura 13 mostra uma alinhamento de sequência de aminoácido de constructos da região variável de cadeia pesada de ICR62 humanizado comparada às sequências de ICR62 de rato. As manchas representam identidade de resíduos de aminoácido em uma posição dada dentro de um constructo dado.

[064] A figura 14 mostra um ensaio de ligação de FcgamaRIIIa-Fc usando células CHO que exibem FcgamaRIIIa humano recombinante. Um anticorpo de IgG1 anti-EGFR humanizado I-HHB/KC glicoengendrado foi comparado a um anticorpo não glicoengendrado (Wt).

[065] A figura 15 mostra um perfil de oligossacarídeo MALD/TOF-MS para o anticorpo de IgG1 anti-EGFR humanizado glicoengendrada, I-HHB/KC. A glicoengenharia obtida por superexpressão nas células que produzem anticorpo de genes que codificam enzimas com atividades de GnTIII e Golgi Manosidase II, produzindo acima de 70 % de oligossacarídeos lidados a Fc-Asn297 não fucosilados.

[066] A figura 16 mostra um perfil de precisão anti-EGFR ($n = 6$ replica através da faixa de calibração) para a determinação de anti-EGFR em 1 % de matriz de soro de macaco (mistura de soro de macaco CMS25/31/33, fornecida por HLS).

[067] A figura 17 mostra uma curva de calibração anti-EGFR representativa para a determinação de anti-EGFR em 1 % de matriz de soro de macaco.

[068] A figura 18 mostra concentrações séricas de anti-EGFR no Dia 1 da administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cinomolgos machos.

[069] A figura 19 mostra concentrações séricas de anti-EGFR no Dia 1 de administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cinomolgos fêmeas.

[070] A figura 20 mostra o relacionamento entre as áreas sob as curvas de concentração-tempo de anti-EGFR sérico (AUC_{168}) e o nível de dose no Dia 1 da administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cinomolgos.

[071] A figura 21 mostra concentrações séricas de anti-EGFR durante a administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cinomolgos machos.

[072] A figura 22 mostra concentrações séricas de anti-EGFR durante a administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos cinomolgos fêmeas.

[073] A figura 23 mostra o perfil de MALDI/TOF-MS de oligossa-

carídeos do anticorpo anti-EGFR engendrado em Fc (glicoengendrado) usado para os estudos em macaco *in vivo* descritos nos Exemplos aqui abaixo.

[074] A figura 24 mostra a ligação a EGFR expressado na superfície de células de carcinoma epidermóide A431 humano. O anticorpo usado para o estudo de ligação foi o anticorpo anti-EGFR engendrado em Fc (constructo I-HHB) usado para os estudos em macaco *in vivo* descritos nos Exemplos aqui abaixo.

[075] A figura 25 mostra a ligação ao EGFR expressado na superfície de células do rim COS-7 de macaco. O anticorpo usado foi o anticorpo anti-EGFR (cadeia pesada de I-HHB; cadeia leve de I-KC). Para referência, a ligação a células que expressam EGFR humano pequenas, células do câncer de mama MCF-7, é mostrada.

[076] A figura 26 mostra a ligação de Fc-FcgamaRIIIa usando uma célula inteira (células CHO engendradas para expressar FcgRIIIa humano em sua superfície). O anticorpo usado foi o anticorpo anti-EGFR engendrado em Fc (glicoengendrada) usado para os estudos em macaco *in vivo* descritos nos Exemplos aqui abaixo. A ligação para um anticorpo de IgG1 de controle não engendrado em Fc (não modificada) é mostrada para comparação.

[077] A figura 27 mostra ADCC mediado por anticorpo anti-EGFR engendrado em Fc (glicoengendrada). As células alvo são células de carcinoma pulmonar humano A549. A atividade de ADCC para a forma não engendrada em Fc (não modificada) do anticorpo é mostrada para comparação.

[078] A figura 28 mostra ADCC mediado por anticorpo anti-EGFR engendrado em Fc (glicoengendrado). As células alvo são linhagem de célula de queratinócito de macaco cinomolgo CYNOM-K1. A atividade de ADCC para a forma não engendrada em Fc (não modificada) do anticorpo é mostrada para comparação.

[079] A figura 29 mostra a ligação alvo de EGFR de várias variantes do constructo de cadeia leve com base no constructo I-KC emparelhado com ao constructo I-HHD de cadeia pesada.

Descrição Detalhada da Invenção

[080] Os termos são usados aqui como geralmente usados na técnica, a menos que de outro modo definido como segue.

[081] Como aqui usado, o termo anticorpo é intencionado a incluir moléculas de anticorpo inteiro, incluindo anticorpos monoclonais, polyclonais e multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos), assim como fragmentos de anticorpo tendo a região Fc e retendo especificidade de ligação, e proteínas de fusão que incluem uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina e que retêm a especificidade de ligação. Também abrangidos são fragmentos de anticorpo que retêm a especificidade de ligação incluindo, mas não limitados a, fragmentos de VH, fragmentos de VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')2, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicorpos, diacorpos, triacorpos, e tetracorpos (ver, por exemplo, Hudson e Souriau, *Nature Med.* 9: 129134 (2003)). Também abrangidos são anticorpos humanizados, primatizados e quiméricos.

[082] Como aqui usado, o termo região Fc é intencionado a referir-se a uma região de terminal C de uma cadeia pesada de IgG. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de IgG possam variar levemente, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida para estender-se do resíduo de aminoácido na posição Cys226 ao término carboxila.

[083] Como aqui usado, o termo região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina é intencionado a incluir variantes alélicas que ocorrem naturalmente da região Fc de uma imunoglobulina assim como variantes tendo alterações que produzem substituições, adições, ou supressões mas que não diminuem substancialmente a capacidade

da imunoglobulina para mediar funções efetoras (tais como citotoxicidade celular dependente de anticorpo). Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser suprimidos do término N ou término C da região Fc de uma imunoglobulina sem perda substancial da função biológica. Tais variantes podem ser selecionadas de acordo com regras gerais conhecidas na técnica de modo a ter efeito mínimo na atividade. (Ver, por exemplo, Bowie, J. U. *et al.*, *Science* 247:1306-1310 (1990)).

[084] Como aqui usado, o termo EGFR refere-se ao receptor do fator de crescimento epidérmico humano (também conhecido como HER-1 ou Erb-B1) (Ulrich, A. *et al.*, *Nature* 309:418-425 (1984); SwissProt Accession NºP00533; números de acesso secundários: O00688, O00732, P06268, Q14225, Q92795, Q9BZS2, Q9GZX1, Q9H2C9, Q9H3C9, Q9UMD7, Q9UMD8, Q9UMG5), assim como isoformas que ocorrem naturalmente e variantes destas. Tais isoformas e variantes incluem mas não limitadas à variante de EGFRvIII, produtos de união alternativos (por exemplo, como identificado por números de Acesso SwissProt P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), variantes GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962, e PRO-988 (Livingston, R.J. *et al.*, NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, WA (2004)), e outros identificados pelos números de acesso seguintes: NM_005228,3, NM_201282,1, NM_201283,1, NM_201284,1 (mRNAs de REFSEQ); AF125253,1, AF277897,1, AF288738,1, AI217671,1, AK127817,1, AL598260,1, AU137334,1, AW163038,1, AW295229,1, BCO57802,1, CB160831,1, K03193,1, U48722,1, U95089,1, X00588,1, X00663,1; H54484S1, H54484S3, H54484S2 (montagem de MIPS); DT.453606, DT.86855651, DT.95165593, DT.97822681, DT.95165600, DT.100752430, DT.91654361, DT.92034460, DT.92446349, DT.97784849, DT.101978019, DT.418647, DT.86842167, DT.91803457, DT.92446350, DT.95153003,

DT.95254161, DT.97816654, DT.87014330, DT.87079224 (montagem de DOTS).

[085] Como aqui usado, o termo ligando de EGFR refere-se a um polipeptídeo que liga-se a e/ou ativa EGFR. O termo inclui formas de precursor ligado a membrana do ligando de EGFR, assim como formas solúveis proteoliticamente processadas do ligando de EGFR.

[086] Como aqui usado, o termo ativação de ligando de EGFR refere-se à transdução de sinal (por exemplo, aquela causada por um domínio de cinase intracelular de resíduos de tirosina fosforilantes do receptor EGFR no EGFR ou um polipeptídeo de substrato) mediada por ligação do ligando de EGFR.

[087] Como aqui usado, o termo doença ou distúrbio caracterizado por ativação ou produção anormais de EGFR ou um ligando de EGFR ou distúrbio relacionado à expressão de EGFR, refere-se a uma condição, que pode envolver ou não malignidade ou câncer, onde a ativação e/ou produção anormais de EGFR e/ou um ligando de EGFR está ocorrendo em células ou tecidos de um paciente tendo, ou predisposto, à doença ou distúrbio.

[088] Como aqui usado, os termos superexpressam, superexpressado, e superexpressando, como usado em combinação com células que expressam EGFR, referem-se às células que têm níveis mensuravelmente mais altos de EGFR na superfície destas comparadas a uma célula normal do mesmo tipo de tecido. Tal superexpressão pode ser causada por amplificação de gene ou por transcrição ou tradução aumentadas. A expressão de EGFR (e, consequentemente, superexpressão) pode ser determinada em um ensaio de diagnóstico ou prognóstico avaliando-se níveis de EGFR presentes na superfície de uma célula ou em um lisato celular por técnicas que são conhecidas no ramo: por exemplo, por intermédio de um ensaio de imunoistoquímica, ensaio de imunofluorescência, ensaio imunoenzimático, ELISA,

citometria de fluxo, radioimunoensaio, Western blot, ligação de ligan-
do, atividade de cinase, etc. (Ver geralmente, CELL BIOLOGY: A LA-
BORATORY HANDBOOK, Celis, J., ed., Academic Press (2d ed.,
1998); CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Coligan, J.E.
et al., eds., John Wiley & Sons (1995-2003); ver também, Sumitomo *et*
al., *Clin. Cancer Res.* 10: 794801 (2004) (que descrevem Western blot,
citometria de fluxo, e imunoistoquímica) os conteúdos inteiros das
quais são aqui incorporados por referência)). Alternativa, ou adicio-
nalmente, uma pessoa pode medir níveis de moléculas de ácido nu-
cléico que codificam EGFR na célula, por exemplo, por intermédio de
técnicas de hibridização fluorescente *in situ*, Southern blotting, ou
PCR. Os níveis de EGFR em células normais são comparados aos
níveis de células afetadas por um distúrbio de proliferação de célula
(por exemplo, câncer) para determinar se EGFR é superexpressado.

[089] Como aqui usado, o termo molécula de ligação de antígeno
refere-se em seu sentido mais amplo a uma molécula que especifica-
mente liga-se a um determinante antigênico. Mais especificamente,
uma molécula de ligação de antígeno que liga-se a EGFR é uma mo-
lécula que especificamente liga-se a um receptor de transmembrana
de 170 kDa, tipicamente designado como o receptor do fator de cres-
cimento epidérmico (EGFR), mas também conhecido como HER-1 ou
ErbB1. Por "especificamente liga-se a" é significado que a ligação é
seletiva para o antígeno e pode ser distinguida de interações indeseja-
das ou não específicas.

[090] Como aqui usado, os termos fusão e quimérico, quando
usados em referência aos polipeptídeos tais como ABMs referem-se
aos polipeptídeos compreendendo sequências de aminoácido deriva-
das de dois ou mais polipeptídeos heterólogos, tais como porções de
anticorpos de espécies diferentes. Para ABMs quiméricas, por exem-
plo, os componentes de ligação que não de antígeno podem ser deri-

vados de uma variedade ampla de espécies, incluindo primatas tais como chimpanzés e seres humanos. A região constante da ABM quimérica é o mais preferivelmente substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo químérico é o mais preferivelmente substancialmente idêntica àquela de um anticorpo anti-EGFR recombinante tendo a sequência de aminoácido da região variável de murino. Os anticorpos humanizados são uma forma particularmente preferida de anticorpo de fusão ou químérico.

[091] Como aqui usado, um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII refere-se aos polipeptídeos que são capazes para catalisar a adição de um resíduo de N-acetilglicosamina (GlcNAc) na ligação β -1-4 ao manosídeo β -ligado do núcleo de trimanosila de oligossacarídeos N-ligados. Isto inclui polipeptídeos de fusão que exibem atividade enzimática similar a, mas não necessariamente idêntica a, uma atividade de β (1,4)-N-acetilglicosaminiltransferase III, também conhecida como β -1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglicosaminil-transferase (EC 2.4.1.144), de acordo com o Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), como medido em um ensaio biológico particular, com ou sem dependência de dose. No caso onde a dependência de dose existe, é necessário que não seja idêntica àquela de GnTIII, mas ao invés substancialmente similar à dependência de dose em uma atividade dada quando comparada à GnTIII (isto é, o polipeptídeo candidato exibirá atividade maior ou não mais do que cerca de 25 vezes menos e, preferivelmente, não mais do que cerca de dez vezes menos atividade, e o mais preferivelmente, não mais do que cerca de três vezes menos atividade em relação a GnTIII.)

[092] Como aqui usado, o termo variante (ou análogo) refere-se a um polipeptídeo que difere de um polipeptídeo especificamente relaci-

onado da invenção por inserções, supressões, e substituições de aminoácido, criadas usando, por exemplo, técnicas de DNA recombinante. As variantes das ABMs da presente invenção incluem moléculas de ligação de antígeno quiméricas, primatizadas ou humanizadas em que um ou vários dos resíduos de aminoácido são modificados por substituição, adição e/ou supressão em tal maneira que não substancialmente afeta a afinidade de ligação de antígeno (por exemplo, EGFR). A orientação em determinar que resíduos de aminoácido podem ser substituídos, adicionados ou suprimidos sem abolir as atividades de interesse, pode ser encontrada comparando-se a sequência do polipeptídeo particular com aquela de peptídeos homólogos e minimizando o número de mudanças na sequência de aminoácido feitas em regiões de homologia alta (regiões conservadas) ou substituindo-se aminoácidos com sequência de consenso.

[093] Alternativamente, variantes recombinantes que codificam estes mesmos polipeptídeos ou similares podem ser sintetizadas ou selecionadas fazendo-se uso da "redundância" no código genético. Várias substituições de códon, tais como as mudanças silenciosas que produzem vários sítios de restrição, podem ser introduzidas para otimizar a clonagem em um vetor de plasmídeo ou viral ou expressão em um sistema procariótico ou eucariótico particular. As mutações no sequência de polinucleotídeo podem ser refletidas no polipeptídeo ou domínios de outros peptídeos adicionados ao polipeptídeo para modificar as propriedades de qualquer parte do polipeptídeo, para mudar características tais como afinidades de ligação de ligando, afinidades intercadeia, ou taxa de degradação/regeneração.

[094] Preferivelmente, "substituições" de aminoácido são o resultado de substituir um aminoácido com um outro aminoácido tendo propriedades estruturais e/ou químicas similares, isto é, substituições de aminoácido conservativas. As substituições de aminoácido "conserva-

tivas" podem ser feitas na base de similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofilicidade, e/ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos. Por exemplo, aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilaalanina, triptofano, e metionina; aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, e glutamina; aminoácidos positivamente carregados (básico) incluem arginina, lisina, e histidina; e aminoácidos negativamente carregados (ácido) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. "Inserções" ou "supressões" estão preferivelmente na faixa de cerca de 1 a 20 aminoácidos, mais preferivelmente 1 a 10 aminoácidos. A variação permitida pode ser experimentalmente determinada fazendo-se sistematicamente inserções, supressões, ou substituições de aminoácidos em uma molécula de polipeptídeo usando técnicas de DNA recombinante e avaliando as variantes recombinantes resultantes quanto à atividade.

[095] Como aqui usado, o termo humanizado é usado para referir-se a uma molécula de ligação de antígeno derivada de uma molécula de ligação de antígeno não humana, por exemplo, um anticorpo de murino, que retém ou substancialmente retém as propriedades de ligação de antígeno da molécula precursora mas que é menos imunogênico em seres humanos. Isto pode ser obtido por vários métodos incluindo (a) enxertar os domínios variáveis não humanos inteiros em regiões constantes humanas para gerar anticorpos quiméricos, (b) enxertar apenas as CDRs não humanas nas regiões de estrutura e constantes humanas com ou sem retenção de resíduos de estrutura críticos (por exemplo, aqueles que são importantes para reter boa afinidade de ligação de antígeno ou funções de anticorpo), ou (c) transplantar os domínios variáveis não humanos inteiros, mas "ocultando-os" com uma seção semelhante à humana por substituição de resíduos superficiais. Tais métodos são descritos em Jones *et al.*, Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,

81:6851-6855 (1984); Morrison e Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994), todos os quais são incorporados por referência em sua totalidade aqui. Existem geralmente 3 regiões determinantes de complementaridade, ou CDRs, (CDR1, CDR2 e CDR3) em cada um dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo, que são flanqueados por quatro sub-regiões de estrutura (isto é, FR1, FR2, FR3, e FR4) em cada um dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Um debate de anticorpos humanizados pode ser encontrado, *inter alia*, na Patente U.S. Nº 6.632.927, e no Pedido U.S. publicado Nº 2003/0175269, ambos dos quais são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

[096] Similarmente, como aqui usado, o termo primatizado é usado para referir-se à uma molécula de ligação de antígeno derivada de uma molécula de ligação de antígeno que não de primata, por exemplo, um anticorpo de murino, que retém ou substancialmente retém as propriedades de ligação de antígeno da molécula precursora mas que é menos imunogênico em primatas.

[097] No caso onde existem duas ou mais definições de um termo que é usado e/ou aceito dentro da técnica, a definição do termo como aqui usado é intencionada a incluir todos os tais significados a menos que explicitamente estabelecido ao contrário. Um exemplo específico é o uso do termo "região determinante de complementaridade" ("CDR") para descrever os sítios de combinação de antígeno não contíguos encontrados dentro da região variável de polipeptídeos tanto de cadeia pesada quanto leve. Esta região particular foi descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) e por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), que são incorporados aqui por referência,

onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácido quando comparados em oposição um ao outro. Não obstante, a aplicação da definição para referir-se à uma CDR de um anticorpo ou variantes deste é intencionada a estar dentro do escopo do termo como definido e usado aqui. Os resíduos de aminoácido apropriados que abrangem as CDRs como definido por cada uma das referências citadas acima são apresentados abaixo na Tabela I como uma comparação. Os números de resíduo exatos que abrangem uma CDR particular variarão dependendo da sequência e tamanho da CDR. Aqueles versados na técnica podem determinar rotineiramente quais resíduos compreendem uma CDR particular dada a região variável sequência de aminoácido do anticorpo.

Tabela 1. CDR Definições¹

	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 de V _H	31 a 35	26 a 32	26 a 35
CDR2 de V _H	50 a 65	52 a 58	50 a 58
CDR3 de V _H	95 a 102	95 a 102	95 a 102
CDR1 de V _L	24 a 34	26 a 32	24 a 34
CDR2 de V _L	50 a 56	50 a 52	50 a 56
CDR3 de V _L	89 a 97	91 a 96	89 a 97

¹Numeração de todas as definições de CDR na Tabela 1 está de acordo com as convenções de numeração apresentadas por Kabat *et al.* (ver abaixo).

²"AbM" refere-se às CDRs como definido pelo software de modelagem de anticorpo "AbM" da Oxford Molecular.

[098] Kabat *et al.* também definiram um sistema de numeração para sequências de domínio variável que é aplicável a qualquer anticorpo. Uma pessoa versada na técnica pode atribuir não ambiguamente este sistema de "numeração de Kabat" a qualquer sequência de domínio variável, sem confiança em nenhum dado experimental além da se-

quênciam por si só. Como aqui usado, "numeração de Kabat" refere-se ao sistema de numeração apresentado por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que de outro modo especificado, as referências à numeração de posições do resíduo de aminoácido específicas em uma ABM são de acordo com o sistema de numeração de Kabat. As sequências da listagem de sequência (isto é, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 127) são não numeradas de acordo com o sistema de numeração de Kabat. Entretanto, como estabelecido acima, está bem dentro da habilidade comum de uma pessoa versada na técnica para determinar o esquema de numeração de Kabat de qualquer sequência da região variável na Listagem de Sequência com base na numeração das sequências como apresentado nesta.

[099] Por um ácido nucléico ou polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo pelo menos, por exemplo, 95 % "idêntica" a uma sequência de nucleotídeo de referência da presente invenção, é intencionado que a sequência de nucleotídeo do polinucleotídeo é idêntica à sequência de referência exceto que a sequência de polinucleotídeo pode incluir até cinco mutações de ponto por cada 100 nucleotídeos da sequência de nucleotídeo de referência. Em outras palavras, para obter um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo pelo menos 95 % idêntica a uma sequência de nucleotídeo de referência, até 5 % dos nucleotídeos na sequência de referência podem ser suprimidos ou substituídos com um outro nucleotídeo, ou vários nucleotídeos até 5 % dos nucleotídeos totais na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência.

[0100] Como um assunto prático, se qualquer molécula de ácido nucléico particular ou polipeptídeo for pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma sequência de nucleotídeo ou sequência de polipeptídeo da presente invenção pode ser determi-

nada convencionalmente usando programas de computador conhecidos. Um método preferido para determinar o melhor emparelhamento global entre uma sequência de consulta (uma sequência da presente invenção) e uma sequência de assunto, também referida como um alinhamento de sequência global, pode ser determinado usando o programa de computador FASTDB com base no algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). Em um alinhamento de sequência as sequências de consulta e assunto são ambas sequências de DNA. Uma sequência de RNA pode ser comparada convertendo-se U's a T's. O resultado do dito alinhamento de sequência global está em porcentagem de identidade. Parâmetros preferidos usados em um alinhamento de FASTDB de sequências de DNA para calcular a porcentagem de identidade são: Matriz = Unitária, k-tupla = 4, Penalidade de Ligação Imperfeita = 1, Penalidade de União = 30, Extensão do Grupo de Randomização = 0, Contagem de Corte = 1, Penalidade de Descontinuidade = 5, Penalidade da Extensão da Abertura 0,05, Tamanho da Janela = 500 ou o comprimento da sequência de nucleotídeo de assunto, qualquer que seja a mais curta.

[0101] Se a sequência de assunto for mais curta do que a sequência de consulta por causa de supressões em 5' ou 3', não por causa das supressões internas, uma correção manual deve ser feita aos resultados. Isto é porque o programa FASTDB não é responsável por truncamentos em 5' e 3' da sequência de assunto quando calculando a porcentagem de identidade. Para sequências de assunto truncadas nas extremidades 5' ou 3', em relação à sequência de consulta, a porcentagem de identidade é corrigida calculando-se o número de bases da sequência de consulta que são 5' e 3' da sequência de assunto, que não são emparelhadas/alinhas, como uma porcentagem das bases totais da sequência de consulta. Se um nucleotídeo for emparelhado/alinhadado é determinado por resultados do alinhamento de sequência de FAS-

TDB. Esta porcentagem depois é subtraída da porcentagem de identidade, calculada pelo programa FASTDB acima usando os parâmetros específicos, para chegar em uma contagem de porcentagem de identidade final. Esta contagem corrigida é aquela que é usada para os propósitos da presente invenção. Apenas as bases fora das bases 5' e 3' da sequência de assunto, como exibido pelo alinhamento de FASTDB, que não são emparelhadas/alinhasadas com a sequência de consulta, são calculadas para os propósitos de ajustar manualmente a contagem de porcentagem de identidade.

[0102] Por exemplo, uma sequência de assunto de 90 bases é alinhada a uma sequência de consulta de 100 bases para determinar a porcentagem de identidade. As supressões ocorrem na extremidade 5' da sequência de assunto e portanto, o alinhamento de FASTDB não mostra um emparelhamento/alinhamento das primeiras 10 bases na extremidade 5'. As 10 bases não emparelhadas representam 10 % da sequência (número de bases nas extremidades 5' e 3' não emparelhadas/número total de bases na sequência de consulta) de modo que 10 % são subtraídos da contagem de porcentagem de identidade calculada pelo programa FASTDB. Se as 90 bases remanescentes fossem perfeitamente emparelhadas a porcentagem de identidade final seria de 90 %. Em um outro exemplo, uma sequência de assunto 90 bases é comparada com uma sequência de consulta de 100 bases. Neste momento as supressões são supressões internas de modo que não existe nenhuma base na 5' ou 3' da sequência de assunto que não é emparelhada/alinhada com a de consulta. Neste caso a porcentagem de identidade calculada por FASTDB não é manualmente corrigida. Mais uma vez, apenas as bases 5' e 3' da sequência de assunto que não são emparelhadas/alinhasadas com sequência de consulta são manualmente corrigidas. Nenhuma outra correção manual deve ser feita para os propósitos da presente invenção.

[0103] Por um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido pelo menos, por exemplo, 95 % "idêntica" a uma sequência de consulta de aminoácido da presente invenção, é intencionado que a sequência de aminoácido do paciente polipeptídeo seja idêntica à sequência de consulta exceto que a sequência de assunto de polipeptídeo pode incluir até cinco alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos da sequência de consulta de aminoácido. Em outras palavras, para obter um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido pelo menos 95 % idêntica a uma sequência de consulta de aminoácido, até 5 % dos resíduos de aminoácido na sequência de assunto podem ser inseridos, suprimidos, ou substituídos com um outro aminoácido. Estas alterações da sequência de referência podem ocorrer nas posições de terminal amino ou carbóxi da sequência de referência de aminoácido ou em qualquer lugar entre aquelas posições do terminal, intercaladas individualmente entre resíduos na sequência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência.

[0104] Como um assunto prático, se qualquer polipeptídeo particular for pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntico a um polipeptídeo de referência pode ser determinado convencionalmente usando programas de computador conhecidos. Um método preferido para determinar o melhor emparelhamento global entre uma sequência de consulta (uma sequência da presente invenção) e uma sequência de assunto, também referida como um alinhamento de sequência global, pode ser determinado usando o programa de computador FASTDB com base no algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). Em um alinhamento de sequência as sequências de consulta e assunto tanto são sequências de nucleotídeo ou quanto sequências de aminoácido. O resultado do dito alinhamento de sequência global está em porcentagem de identidade. Os parâmetros preferidos usados em um alinhamento de aminoácido FASTDB são: Matriz =

PAM 0, k-tupla = 2, Penalidade da Ligação Imperfeita = 1, Penalidade da União = 20, Extensão do Grupo de Randomização = 0, Contagem de corte = 1, Tamanho da Janela = extensão da sequência, Penalidade de Descontinuidade = 5, Penalidade da Extensão da Abertura = 0,05, Tamanho da Janela = 500 ou a extensão da sequência de assunto de aminoácido, qualquer que seja a mais curta.

[0105] Se a sequência de assunto for mais curta do que a sequência de consulta devido às supressões de terminal N ou C, não por causa das supressões internas, uma correção manual deve ser feita aos resultados. Isto é porque o programa FASTDB não é responsável por truncamentos de terminal N e C da sequência de assunto quando calculando a porcentagem de identidade global. Para as sequências de assunto truncadas nos términos N e C, em relação à sequência de consulta, a porcentagem de identidade é corrigida calculando-se o número de resíduos da sequência de consulta que são de terminal N e C da sequência de assunto, que não são emparelhados/alinhados com um resíduo de assunto correspondente, como uma porcentagem destas bases totais da sequência de consulta. Se um resíduo for emparelhado/alinhado é determinado pelos resultados do alinhamento de sequência de FASTDB. Esta porcentagem depois é subtraída da porcentagem de identidade, calculada pelo programa FASTDB acima usando os parâmetros específicos, para chegar em uma contagem de porcentagem de identidade final. Esta contagem de porcentagem de identidade final é aquela que é usada para os propósitos da presente invenção. Apenas resíduos para os términos N e C da sequência de assunto, que não são emparelhados/alinhados com a sequência de consulta, são considerados para os propósitos de ajustar manualmente a contagem de porcentagem de identidade. Isto é, apenas posições do resíduo de consulta fora dos resíduos de terminal N e C mais afastados da sequência de assunto.

[0106] Por exemplo, uma sequência de assunto de 90 resíduos de aminoácido é alinhada com uma sequência de consulta de 100 resíduos para determinar a porcentagem de identidade. A supressão ocorre no término N da sequência de assunto e portanto, o alinhamento de FASTDB não mostra um emparelhamento/alinhamento dos primeiros 10 resíduos no término N. Os 10 resíduos não emparelhados representam 10 % da sequência (número de resíduos nos términos N e C não emparelhados/número total de resíduos na sequência de consulta) de modo que 10 % são subtraídos da contagem de porcentagem de identidade calculada pelo programa FASTDB. Se os 90 resíduos remanescentes fossem perfeitamente emparelhados a porcentagem de identidade final seria de 90 %. Em um outro exemplo, uma sequência de assunto de 90 resíduos é comparada com uma sequência de consulta de 100 resíduos. Neste momento as supressões são supressões internas de modo que não existe nenhum resíduo nos términos N ou C da sequência de assunto que não é emparelhado/alinhado com o de consulta. Neste caso a porcentagem de identidade calculada por FASTDB não é manualmente corrigida. Mais uma vez, apenas as posições do resíduo fora das extremidades de terminal N e C da sequência de assunto, como exibido no alinhamento de FASTDB, que não são emparelhadas/alinhadas com a sequência de consulta são manualmente corrigidas. Nenhum outra correção manual deve ser feita para os propósitos da presente invenção.

[0107] Como aqui usado, um ácido nucléico que "hibridiza sob condições severas" a uma sequência de ácido nucléico da invenção, refere-se a um polinucleotídeo que hibridiza em uma incubação noturna a 42° C em uma solução compreendendo 50 % de formamida, 5x de SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), 5x de solução de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano, e 20 µg/ml de DNA de esperma de salmão cisalha-

do, desnaturado, seguido por lavagem dos filtros em 0,1x de SSC a cerca de 65° C.

[0108] Como aqui usado, o termo domínio de localização de Golgi refere-se à sequência de aminoácido de um polipeptídeo residente de Golgi que é responsável por fixar o polipeptídeo no local dentro do complexo de Golgi. Geralmente, os domínios de localização compreendem "caudas" de terminal amino de uma enzima.

[0109] Como aqui usado, o termo função efetora refere-se àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc variante da sequência de aminoácido) de um anticorpo. Os exemplos de funções efetoras do anticorpo incluem, mas são não limitados a, afinidade de ligação do receptor de Fc, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), secreção de citocina, captação de antígeno mediada por complexo imune aumentada por células que apresentam antígeno, infra-regulação de receptores de superfície celular, etc.

[0110] Como aqui usado, os termos engendar, engendrado, engenharia e engenharia de glicosilação são considerados a incluir qualquer manipulação do padrão de glicosilação de um polipeptídeo recombinante ou que ocorre naturalmente ou fragmento deste. A engenharia de glicosilação inclui a engenharia metabólica do mecanismo de glicosilação de uma célula, incluindo manipulações genéticas dos caminhos de síntese de oligossacarídeo para obter glicosilação alterada de glicoproteínas expressadas em células. Além disso, a engenharia de glicosilação inclui os efeitos de mutações e ambiente celular na glicosilação. Em uma modalidade, a engenharia de glicosilação é uma alteração na atividade de glicosiltransferase. Em uma modalidade particular, a engenharia resulta em atividade de glicosaminiltransferase e/ou atividade de fucosiltransferase alteradas.

[0111] Como aqui usado, o termo célula hospedeira abrange qualquer tipo de sistema celular que pode ser engendrado para gerar os polipeptídeos e moléculas de ligação de antígeno da presente invenção. Em uma modalidade, a célula hospedeira é engendrada para permitir a produção de uma molécula de ligação de antígeno com glicocoformas modificadas. Em uma modalidade preferida, a molécula de ligação de antígeno é um anticorpo, fragmento de anticorpo, ou proteína de fusão. Em certas modalidades, as células hospedeiras foram manipuladas ainda para expressar níveis aumentados de um ou mais polipeptídeos tendo atividade de GnTIII. As células hospedeiras incluem células cultivadas, por exemplo, células mamíferas cultivadas, tais como células CHO, células HEK293-EBNA, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 ou células de hibridoma, células de levedura, células de inseto, e células vegetais, para citar apenas algumas, mas também células compreendidas dentro de um animal transgênico, planta transgênica ou planta cultivada ou tecido animal.

[0112] Como aqui usado, o termo citotoxicidade celular mediada por Fc inclui citotoxicidade celular dependente de anticorpo e citotoxicidade celular mediada por uma proteína de fusão de Fc solúvel contendo uma região Fc humana. Ele é um mecanismo imune que leva à lise de "células alvejadas em anticorpo" por "células efetoras imunes humanas", em que:

[0113] As células efetoras imunes humanas são uma população de leucócitos que exibem receptores de Fc em sua superfície através da qual elas ligam-se à região Fc de anticorpos ou de proteínas de fusão de Fc e realizam funções efetoras. Uma tal população pode incluir, mas não é limitada a, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e/ou células exterminadoras naturais (NK).

[0114] As células alvejadas em anticorpo são células ligadas pelos anticorpos ou proteínas de fusão de Fc. Os anticorpos ou proteínas de fusão de Fc ligam-se para alvejar células por intermédio do terminal N de porção da proteína à região Fc.

[0115] Como aqui usado, o termo citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada é definido como um aumento no número de "células alvejadas em anticorpo" que são lisadas em um tempo dado, em uma concentração dada do anticorpo, ou da proteína de fusão de Fc, no meio que circunda as células alvo, pelo mecanismo de citotoxicidade celular mediada por Fc definido acima, e/ou uma redução na concentração de anticorpo, ou de proteína de fusão de Fc, no meio que circunda as células alvo, necessários para obter a lise de um número dado de "células alvejadas em anticorpo", em um tempo dado, pelo mecanismo de citotoxicidade celular mediada por Fc. O aumento em citotoxicidade celular mediada por Fc é relativo à citotoxicidade celular mediada pelo mesmo anticorpo, ou proteína de fusão de Fc, produzida pelo mesmo tipo de células hospedeiras, usando os mesmos métodos de produção, purificação, formulação e armazenamento padrão, que são conhecidos àquelas versados na técnica, mas que não foram produzidos por células hospedeiras engendradas para expressar a glicosiltransferase GnTIII pelos métodos descritos aqui.

[0116] Por anticorpo tendo citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) aumentada é significado um anticorpo, visto que este termo é definido aqui, tendo ADCC aumentada como determinado por qualquer método adequado conhecido àqueles versados na técnica. Um ensaio de ADCC *in vitro* aceito é como segue:

- 1) o ensaio usa células alvo que são conhecidas expressar o antígeno alvo reconhecido pela região de ligação de antígeno do anticorpo;
- 2) o ensaio usa células mononucleares do sangue periférico

(PBMCs) humanas, isoladas do sangue de um doador saudável aleatoriamente escolhido, como células efetoras;

3) o ensaio é realizado de acordo com o protocolo seguinte:

i) as PBMCs são isoladas usando procedimentos de centrifugação de densidade padrão e são colocadas em suspensão a 5×10^6 células/ml em meio de cultura celular RPMI;

ii) as células alvo são cultivadas por métodos de cultura de tecido padrão, colhidas da fase de crescimento exponencial com uma viabilidade mais alta do que 90 %, lavadas em meio de cultura celular RPMI, rotuladas com 100 micro-Curies de ^{51}Cr , lavadas duas vezes com meio de cultura celular, e recolocadas em suspensão em meio de cultura celular em uma densidade de 105 células/ml;

iii) 100 microlitros da suspensão de célula alvo final acima são transferidos a cada cavidade de uma placa microtituladora de 96 cavidades;

iv) o anticorpo é periodicamente diluído de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml em meio de cultura celular e 50 microlitros das soluções de anticorpo resultantes são adicionados às células alvo na placa microtituladora de 96 cavidades, testando em triplicata várias concentrações de anticorpo abrangendo a faixa de concentração total acima;

v) para os controles de liberação máxima (MR), 3 cavidades adicionais na placa contendo as células alvo rotuladas, recebem 50 microlitros de uma solução aquosa a 2 % (V/V) de detergente não iônico (Nonidet, Sigma, St. Louis), ao invés da solução de anticorpo (caso iv acima);

vi) para os controles de liberação espontânea (SR), 3 cavidades adicionais na placa contendo as células alvo rotuladas, recebem 50 microlitros de meio de cultura celular RPMI ao invés da solução de anticorpo (caso iv acima);

vii) a placa microtituladora de 96 cavidades depois é centrifu-

gada a 50 x g durante 1 minuto e incubada durante 1 hora a 4° C;

viii) 50 microlitros da suspensão de PBMC (caso i acima) são adicionados a cada cavidade para produzir uma ração de célula efetora:alvo de 25:1 e as placas são colocadas em uma incubadora sob atmosfera de CO₂ a 5 % a 37° C durante 4 horas;

ix) o sobrenadante isento de célula de cada cavidade é colhido e a radioatividade experimentalmente liberada (ER) é quantificada usando um contador gama;

x) a porcentagem da lise específica é calculada para cada concentração de anticorpo de acordo com a fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, onde ER é a radioatividade média quantificada (ver caso ix acima) para aquela concentração de anticorpo, MR é a radioatividade média quantificada (ver caso ix acima) para os controles de MR (ver caso v acima), e SR é a radioatividade média quantificada (ver caso ix acima) para os controles de SR (ver caso vi acima);

4) "ADCC aumentada" é definida como um aumento na porcentagem máxima de lise específica observada dentro da faixa de concentração de anticorpo testada acima, e/ou uma redução na concentração de anticorpo necessária para obter metade da porcentagem máxima de lise específica observada dentro da faixa de concentração de anticorpo testada acima. O aumento em ADCC é relativo à ADCC, medido com o ensaio acima, mediado pelo mesmo anticorpo, produzido pelo mesmo tipo de células hospedeiras, usando os mesmos métodos de produção, purificação, formulação e armazenamento padrão, que são conhecidos àqueles versados na técnica, mas que não foram produzidos por células hospedeiras engendradas para superexpressar GnTIII.

[0117] Em um aspecto, a presente invenção é relacionada às moléculas de ligação de antígeno tendo a especificidade de ligação do ICR62 de rato (isto é, liga-se substancialmente ao mesmo epitopo), e à descoberta de que suas funções efetoras podem ser realçadas por gli-

cosilação alterada. Em uma modalidade, a molécula de ligação de antígeno é um anticorpo quimérico. Em uma modalidade preferida, a invenção é direcionada a um anticorpo quimérico, ou um fragmento deste, compreendendo uma ou mais (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) das CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOs: 53 a 108 e/ou SEQ ID NOs: 122 a 127. Especificamente, em uma modalidade preferida, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo: (a) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 122, e SEQ ID NO: 124; (b) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, e SEQ ID NO: 126; e (c) SEQ ID NO: 108. Em uma outra modalidade preferida, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo (a) uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 112 e SEQ ID NO: 114; (b) uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 116 e SEQ ID NO: 118; e (c) SEQ ID NO: 119. Em uma modalidade, qualquer um destes polinucleotídeos codifica um polipeptídeo de fusão.

[0118] Em uma outra modalidade, a molécula de ligação de antígeno compreende o domínio V_H do anticorpo ICR62 de rato codificado pela SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2, ou uma variante destas; e um polipeptídeo que não de murino. Em uma outra modalidade preferida, a invenção é direcionada a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo o domínio V_L do anticorpo de rato codificado pela SEQ ID NO: 43 ou SEQ ID NO: 44, ou uma variante destas; e um polipeptídeo que não de murino.

[0119] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a moléculas de ligação de antígeno compreendendo uma ou mais (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) CDRs truncadas de ICR62. Tais CDRs truncadas conterão, em um mínimo, os resíduos de aminoácido que determinam especificidade para a CDR dada. Por "resíduo que determina especificidade" é significado aqueles resíduos que são diretamente envolvidos na interação com o antígeno. Em geral, apenas cerca de um quinto a um terço dos resíduos em uma CDR dada participam na ligação ao antígeno. Os resíduos determinantes de especificidade em uma CDR particular podem ser identificados, por exemplo, por computação de contatos interatônicos a partir de modelagem tridimensional e determinação da variabilidade de sequência em uma posição de resíduo dada de acordo com os métodos descritos em Padlan *et al.*, FASEB J. 9(1):133-139 (1995), os conteúdos dos quais são por meio desta incorporados por referência em sua totalidade.

[0120] Consequentemente, a invenção também é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) região determinante de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou uma variante ou forma truncada deste contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para a dita região determinante de complementaridade, em que o dito polinucleotídeo isolado codifica um polipeptídeo de fusão. Preferivelmente, tais polinucleotídeos isolados codificam um polipeptídeo de fusão que é uma molécula de ligação de antígeno. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende três regiões determinantes de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou variantes ou formas truncadas deste contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para cada uma das ditas três regiões determinantes de complementaridade. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreende pelo menos uma das CDRs apresentadas nas

Tabelas 2 a 5, abaixo. Em uma outra modalidade, o polinucleotídeo codifica a região variável inteira da cadeia leve ou pesada de um anticorpo quimérico (por exemplo, humanizado). A invenção é direcionada ainda aos polipeptídeos codificados por tais polinucleotídeos.

[0121] Em uma outra modalidade, a invenção é direcionada a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, ou seis) região determinante de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou uma variante ou forma truncada deste contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para a dita região determinante de complementaridade, e compreendendo uma sequência derivada de um polipeptídeo heterólogo. Em uma modalidade, a molécula de ligação de antígeno compreende três regiões determinantes de complementaridade do anticorpo ICR62 de rato, ou variantes ou formas truncadas deste contendo pelo menos os resíduos determinantes de especificidade para cada uma das ditas três regiões determinantes de complementaridade. Em uma modalidade, a molécula de ligação de antígeno compreende pelo menos uma das CDRs apresentadas nas Tabelas 2 a 5, abaixo. Em um outro aspecto, a molécula de ligação de antígeno compreende a região variável de uma cadeia leve ou pesada de anticorpo. Em uma modalidade particularmente útil, a molécula de ligação de antígeno é um anticorpo quimérico, por exemplo, humanizado. A invenção também é direcionada aos métodos de fabricar tais moléculas de ligação de antígeno, e ao uso das mesmas no tratamento de doença, particularmente distúrbios de proliferação de célula em que EGFR é expressado, particularmente em que EGFR é anormalmente expressado (por exemplo, superexpressado) comparado ao tecido normal do mesmo tipo celular. Tais distúrbios incluem, mas não limitados a cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, pele, e rim. Os níveis de ex-

pressão de EGFR podem ser determinados por métodos conhecidos na técnica e aqueles descritos aqui (por exemplo, por intermédio de ensaio de imunoistoquímica, ensaio de imunofluorescência, ensaio de imunoenzimático, ELISA, citometria de fluxo, radioimunoensaio, Western blot, ligação de ligando, atividade de cinase, etc.).

[0122] A invenção também é direcionada a um método para alvejar células que expressam EGFR *in vivo* ou *in vitro*. As células que expressam EGFR podem ser alvejadas para propósitos terapêuticos (por exemplo, para tratar um distúrbio que é tratável por interrupção da sinalização mediada por EGFR, por exemplo bloqueando-se a ligação de ligando, ou alvejando-se células que expressam EGFR para a destruição pelo sistema imune). Em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a um método para alvejar células que expressam EGFR em um paciente compreendendo administrar ao paciente uma composição compreendendo uma ABM da invenção. As células que expressam EGFR também podem ser alvejadas para propósitos de diagnóstico (por exemplo, para determinar se eles são EGFR de expressão, normal ou anormalmente). Assim, a invenção também é direcionada aos métodos para detectar a presença de EGFR ou uma célula que expressa EGFR, *in vivo* ou *in vitro*. Um método de detectar a expressão de EGFR de acordo com a presente invenção compreende contar uma amostra a ser testada, opcionalmente com uma amostra de controle, com uma ABM da presente invenção, sob condições que levam em consideração a formação de um complexo entre a ABM e EGFR. A formação do complexo depois é detectada (por exemplo, por ELISA ou outros métodos conhecidos na técnica). Quando do uso de uma amostra de controle com a amostra de teste, qualquer diferença estatisticamente significante na formação de complexos de ABM-EGFR quando comparando as amostras de teste e controle é indicativo da presença de EGFR na amostra de teste.

Tabela 2

CDR		Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
CDR1 de cadeia pesada	Kabat	GACTACAAGATACAC	54
		GACTACGCCATCAGC	56
		GACTACTATATGCAC	58
		GACTACAAGATATCC	122
	Chothia	GGTTTACATTCACTGACTAC	60
		GGTTACACATTCACTGACTAC	62
		GGTTATTCACTCACTGACTAC	64
	AbM	GGTTTACATTCACTGACTACAAGATACAC	66
		GGTTTACATTCACTGACTACGCCATCAGC	68
		GGTTTACATTCACTGACTACTATATGCAC	70
		GGTTACACATTCACTGACTACTATATGCAC	72
		GGTTATTCACTCACTGACTACAAGATACAC	74
		GGTTCACATTCACTGACTACAAGATATCC	124
CDR2 de cadeia pesada	Kabat	TATTTAACCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CAATGAAAAGTTCAAGAGC	76
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	78
		TATTTAACCTAACAGCGGTTATAGTACCTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	80
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	82
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CAGCCCCAAGCTTCCAAGGC	84
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA CAACGAGAAGTTCCAAGGC	86
		TATTTAACCTAACAGCGGTTATTCGAACTA CGCACAGAAGTTCCAGGGC	88
		TATTTAACCTAACAGCGGTTATGCCACGT CGCACAGAAGTTCCAGGGC	90
		TACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTA	126

CDR		Seqüência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
CDR3 de cadeia pesada	Chothia	CAGCCCCAAGCTTCCAAGGC	
		AATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	92
		AACCCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	94
		AACCCCTAACAGCGGTTATGCCACG	96
	AbM	TATTTAACCTAACAGTGGTTATAGTACC	98
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	100
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	102
		TATTTAACCTAACAGCGGTTATTCGAAC	104
		TATTTAACCTAACAGCGGTTATGCCACG	106
	Kabat Chothia AbM	CTATCCCCAGGCAGTTACTATGTTATGGATGC C	108

Tabela 3

CDR		Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO
CDR1 de cadeia pesada	Kabat	DYKIH	53
		DYAIS	55
		DYYMH	57
		DYKIS	123
	Chothia	GFTFTDY	59
		GYTFTDY	61
		GYSFTDY	63
	AbM	GFTFTDYZIH	65
		GFTFTDYAIS	67
		GFTFTDYYMH	69
		GYTFTDYYMH	71
		GYSFTDYZIH	73
		GFTFTDYZIS	125
CDR2 de cadeia pesada	Kabat	YFPNSGYSTYNEKFKS	75
		GINPNSGYSTYAQKFQG	77
		YFPNSGYSTYAQKFQG	79
		WINPNSGYSTYAQKFQG	81
		WINPNSGYSTYSPSFQG	83
		WINPNSGYSTYNEKFQG	85
		YFPNSGYSNYAQKFQG	87
		YFPNSGYATYAQKFQG	89
		YFPNSGYSTYSPSFQG	127
	Chothia	NPNSGYST	91
		NPNSGYSN	93
		NPNSGYAT	95
CDR3 de cadeia	AbM	YFPNSGYST	97
		GINPNSGYST	99
		WINPNSGYST	101
		YFPNSGYSN	103
		YFPNSGYAT	105
	Kabat		107
	Chothia	LSPGGYYYVMDA	

CDR		Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO
pesada	AbM		

Tabela 4

CDR	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO
CDR1 de cadeia leve de Kabat	KASQNIINNYLN	111
	RASQGINNYLN	113
CDR2 de cadeia leve de Kabat	NTNNLQT	115
CDR3 de cadeia leve de Kabat	LQHNSFPT	117

Tabela 5

CDR	Nucleotide Sequence Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
CDR1 de cadeia leve de Kabat	AAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAAC	112
	CGGGCAAGTCAGGGCATTAACAATTACTTAAAT	114
CDR2 de cadeia leve de Kabat	AATACAAAACAATTGCAAACA	116
	AATACCAACAACCTTGAGACA	118
CDR3 de cadeia leve de Kabat	TTGCAGCATAATAGTTTCCCACG	119

[0123] É conhecido que vários mecanismos são envolvidos na eficácia terapêutica de anticorpos anti-EGFR, incluindo bloqueio de ligação de ligando (por exemplo, EGF, TGF- α , etc.) a EGFR e ativação subsequente de caminhos de sinalização, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), e a indução da parada do crescimento ou diferenciação de terminal.

[0124] O anticorpo monoclonal de rato ICR62 (IgG2b) foi debatido na Publicação PCT Nº WO 95/20045, que é incorporada aqui por referência em sua totalidade. Ele foi direcionado ao epitopo C de EGFR, e mostrou inibir a ligação de ligando, inibir o crescimento *in vitro* de carcinomas de célula escamosa que expressam EGFR, e induzir a regressão de xeno-enxertos de tumores em camundongos atípicos (WO 95/20045; Modjta-

hedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). Como um anticorpo inteiramente de roedor, a administração do anticorpo monoclonal de rato ICR62 aos seres humanos resultou em uma resposta de HARA em alguns pacientes seguindo ao menos uma dose única. (WO 95/20045; Modjtahedi et al., Br. Cancer 73:228-235 (1996)).

[0125] Os anticorpos de camundongo/humanos quiméricos foram descritos. Ver, por exemplo, Morrison, S. L. et al., PNAS 11:6851-6854 (Novembro de 1984); Publicação de Patente Européia Nº 173494; Boulianna, G. L. et al., Nature 312:642 (Dezembro de 1984); Neubeger, M. S. et al., Nature 314:268 (Março de 1985); Publicação de Patente Européia Nº 125023; Tan et al., J. Immunol. 135:8564 (Novembro de 1985); Sun, L. K et al., Hybridoma 5(1):517 (1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066-1074 (1986). Ver no geral, Muron, Nature 312:597 (Dezembro de 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5(3) (Março de 1985); Marx, Science 229:455 (Agosto de 1985); e Morrison, Science 229:12021207 (Setembro de 1985). IMC-C225 (Erbitux®, Imclone) é um anticorpo monoclonal quimérico direcionado contra EGFR e tendo uma região variável de camundongo e uma região constante humana (Ver Herbst e Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). A porção de murino de IMC-225 é derivada de M225, que foi descoberto ligar-se a EGFR e inibir a fosforilação dependente de tirosina cinase induzida por EGF, assim como induzir a apoptose em linhagens de célula de tumor que superexpressam EGFR (Herbst e Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Entretanto, M225 evocou uma reação HAMA em pacientes tratados com o anticorpo em experiências clínicas de Fase I (Herbst e Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). IMC-225 foi testado *in vivo* e *in vitro*, e foi usado em combinação com terapia por radiação e quimioterapia em vários tipos de tumor, incluindo aqueles associados com prognóstico deficiente (Herbst e Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). Entretanto, IMC-225 foi associado com toxicidades tais

como reações alérgicas e cutâneas em pacientes administrados com o anticorpo IMC-225 em experiências clínicas (Herbst e Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)).

[0126] Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM quimérica da presente invenção é um anticorpo humanizado. Métodos para humanizar anticorpos não humanos são conhecidos na técnica. Por exemplo, ABMs humanizadas da presente invenção podem ser preparadas de acordo com os métodos da Pat. U.S. Nº 5.225.539 de Winter, Pat. U.S. Nº 6.180.370 de Queen *et al.*, Pat. U.S. Nº 6.632.927 de Adair *et al.*, ou Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2003/0039649 de Foote, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são aqui incorporados por referência. Preferivelmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos nele a partir de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente tomados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), substituindo-se sequências da região hipervariável para as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos químéricos (Pat. U.S. Nº 4.816.567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos da região hipervariável e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedor. Os anticorpos anti-EGFR humanizados do paciente compreenderão regiões constantes de imunoglobulina humana.

[0127] A escolha de domínios variáveis humanos, tanto leves e pe-

sados, a serem usados em fabricar os anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o assim chamado método de "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é triada contra a biblioteca inteira de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana que é mais próxima àquela do roedor depois é aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Um outro método de selecionar a sequência de estrutura humana é comparar a sequência de cada sub-região individual da estrutura de roedor total (isto é, FR1, FR2, FR3, e FR4) ou alguma combinação das sub-regiões individuais (por exemplo, FR1 e FR2) contra uma biblioteca de sequências da região variável humana conhecidas que correspondem àquela sub-região de estrutura (por exemplo, como determinado pela numeração de Kabat), e escolher a sequência humana para cada sub-região ou combinação que é a mais próxima àquela do roedor (Leung, Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0040606A1, publicada em 27 de Fev. de 2003) (os conteúdos inteiros das quais são por meio desta incorporados por referência). Um outro método usa uma região de estrutura particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)) (os conteúdos inteiros de cada um dos quais são aqui incorporados por referência).

[0128] É mais importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de afinidade alta pelo antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para obter esta meta, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humani-

zados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais podem ser gerados usando programas de computador familiares àqueles versados na técnica (por exemplo, InsightII, Accelrys, Inc. (antigamente MSI), ou em <http://swissmodel.expasy.org>). Estes programas de computador podem ilustrar e exibir estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção destas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam com a capacidade da imunoglobulina candidata para ligar-se ao seu antígeno. Deste modo, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências receptoras e de importação de modo que a característica do anticorpo desejada, tal como afinidade aumentada pelo(s) antígeno(s) alvo, seja obtida. Em geral, os resíduos da região hipervariável são direta e o mais substancialmente envolvidos em influenciar a ligação de antígeno.

[0129] Em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção compreendem uma região Fc humana. Em uma modalidade específica, a região constante humana é IgG1, como apresentado nas SEQ ID NOs: 109 e 110, e apresentadas abaixo:

Sequência de nucleotídeo de IgG1 (SEQ ID NO: 110)

```
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTCCCGG
CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
TCCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGGCCAAATCTTGTGACAAAACTC
ACACATGCCAACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTC
CTCTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACC
AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGG
```

TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCATGCTCCGTATGCTGAGGCTCTGC
 ACAACCACACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

Sequência de aminoácido de IgG1 (SEQ ID NO: 109)

TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAL
 QSSGLYSLSSVVTPPSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKAEPKSCDKTHTCP
 APELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK

[0130] Entretanto, variantes e isoformas da região Fc humana também são abrangidas pela presente invenção. Por exemplo, regiões Fc variantes adequadas para o uso na presente invenção podem ser produzidas de acordo com os métodos mostrados na Pat. U.S. Nº 6.737.056 de Presta (variantes da região Fc com função efetora alterada devido a uma ou mais modificações de aminoácido); ou nos Ped. de Pat. U.S. Nºs 60/439.498; 60/456.041; 60/514.549; ou WO 2004/063351 (regiões Fc variantes com afinidade de ligação aumentada devido à modificação de aminoácido); ou no Ped. de Pat. U.S. Nº 10/672.280 ou WO 2004/099249 (variantes de Fc com ligação alterada a Fc γ R devido à modificação de aminoácido), os conteúdos de cada um dos quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

[0131] Em uma outra modalidade, as moléculas de ligação de antígeno da presente invenção são engendradas para ter afinidade de ligação realçada de acordo, por exemplo, com os métodos descritos na Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2004/0132066 de Balint *et al.*, os conteúdos inteiros da qual são por meio desta incorporados por referência.

[0132] Em uma modalidade, a molécula de ligação de antígeno da presente invenção é conjugada a uma porção adicional, tal como um radiorrótulo ou uma toxina. Tais ABMs conjugadas podem ser produzidas por numerosos métodos que são bem-conhecidos na técnica.

[0133] Uma variedade de radionuclídeos são aplicáveis à presente invenção e aqueles versados na técnica atribuíram à capacidade para determinar facilmente qual radionuclídeo é o mais apropriado sob uma variedade de circunstâncias. Por exemplo, o ¹³¹iodo é um radionuclídeo bem-conhecido usado para a imunoterapia alvejada. Entretanto, a utilidade clínica do ¹³¹iodo pode ser limitada por vários fatores incluindo: meia-vida física de oito dias; desalogenação de anticorpo iodado tanto no sangue quanto em sítios do tumor; e características de emissão (por exemplo, componente gama grande) que pode ser sub-ideal para a deposição de dose localizada no tumor. Com a chegada de agentes quelantes superiores, a oportunidade para ligar grupos quelantes de metal às proteínas tem aumentado as oportunidades para utilizar outros radionuclídeos tais como ¹¹¹índio e ⁹⁰ítrio. ⁹⁰Ítrio fornece vários benefícios para a utilização em aplicações radioimunoterapêuticas: a meia-vida de 64 horas do ⁹⁰ítrio é longa o bastante para permitir acúmulo de anticorpo pelo tumor e, diferentemente por exemplo, do ¹³¹iodo, o ⁹⁰ítrio é um emissor beta puro de energia alta sem nenhuma irradiação gama anexa em sua decomposição, com uma faixa no tecido de 100 a 1000 diâmetros celulares. Além disso, a quantidade mínima de radiação penetrante leva em consideração a administração ao paciente externo de anticorpos rotulados com ⁹⁰ítrio. Adicionalmente, a internalização do anticorpo rotulado não é necessária para a morte celular, e a emissão local de radiação ionizante deve ser letal para células tumorosas adjacentes que carecem do antígeno alvo.

[0134] Dosagens de tratamento únicas eficazes (isto é, quantidades terapeuticamente eficazes) de anticorpos anti-EGFR rotulados com ⁹⁰ítrio variam entre cerca de 5 e cerca de 75 mCi, mais preferivelmente entre cerca de 10 e cerca de 40 mCi. Dosagens ablativas que não destrói a medula de tratamento único eficazes de anticorpos

anti-EGFR rotulados com $^{131}\text{Iodo}$ variam entre cerca de 5 e cerca de 70 mCi, mais preferivelmente entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi. Dosagens ablativas de tratamento único eficazes (isto é, podem requerer transplante de medula óssea autólogo) de anticorpos anti-EGFR rotulados com $^{131}\text{Iodo}$ variam entre cerca de 30 e cerca de 600 mCi, mais preferivelmente entre cerca de 50 e menos do que cerca de 500 mCi. Em combinação com um anticorpo anti-EGFR quimérico, devido à meia-vida de circulação mais longa em relação aos anticorpos de murino, uma dosagem ablativa que não de medula de tratamento único eficaz de anticorpos anti-EGFR quiméricos rotulados com $^{131}\text{Iodo}$ variam entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi, mais preferivelmente menos do que cerca de 30 mCi. Os critérios de imageamento, por exemplo, para o rótulo de $^{111}\text{Índio}$, são tipicamente menores do que cerca de 5 mCi.

[0135] Com respeito aos anticorpos anti-EGFR radiorrotulados, a terapia com estes também pode ocorrer usando um único tratamento de terapia ou usando tratamentos múltiplos. Por causa do componente de radionuclídeo, é preferido que antes do tratamento, células tronco periféricas ("PSC") ou medula óssea ("BM") sejam "colhidas" para pacientes que experiem toxicidade de medula óssea potencialmente fatal que resulta da radiação. BM e/ou PSC são colhidas usando técnicas padrão, e depois purgadas e congeladas para a reinfusão possível. Adicionalmente, é o mais preferido que antes do tratamento um estudo de dosimetria de diagnóstico usando um anticorpo rotulado de diagnóstico (por exemplo, usando $^{111}\text{Índio}$) seja conduzido no paciente, um propósito do qual é garantir que o anticorpo terapeuticamente rotulado (por exemplo, usando $^{90}\text{Ártio}$) não tornar-se-á desnecessariamente "concentrado" em qualquer órgão ou tecido normais.

[0136] Em uma modalidade preferida, a presente invenção é di-

recionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido na Tabela 7 abaixo. Em uma modalidade preferida, a invenção é direcionada a um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência mostrada na Tabela 6 abaixo. A invenção é direcionada ainda a um ácido nucléico isolado compreendendo uma sequência pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma sequência de nucleotídeo mostrada na Tabela 6 abaixo. Em uma outra modalidade, a invenção é direcionada a um ácido nucléico isolado compreendendo uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma sequência de aminoácido na Tabela 7. A invenção também abrange um ácido nucléico isolado compreendendo uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das constructos na Tabela 7 com substituições de aminoácido conservativas.

Tabela 6

Constructo KRUZ VII	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
	CAGGTCA... GAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGTTGTCTTCAAAG GTTCTGGTTAACATTCACTGACTACAAGATAACAC TGGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAGT GGATTGGGTATTTAACCTAACAGTGGTTATAGT ACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAAGGCCACAT TGACTGCAGACAAATCCACCGATACAGCCTATATG GAGCTTACCACTGACATCTGAGGACTCTGCAAC CTATTACTGTACAAGACTATCCCCAGGGGGTTACT ATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGGAGCTTCAGTC ACTGTCTCCTC	2
I-HHA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCTTCTGGATTACATTCACTGACTACGCCATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCAATCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGAACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	4

Constructo	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
I-HHB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	6
I-HHC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCTAACAGCGGTTATAG TACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	8
I-HLA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCA TGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	10
I-HLB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG GTGACCGTCTCCTCA	12

Constructo	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
I-HLC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGAGCCTAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTCAACCCTAACAGCGGTTACA GTACTTACAACGAGAAGTCAAGAGGCCGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	14
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAAG GCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	16
I-HHE	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAAG GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATATC CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	18
I-HHF	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAACCTGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAAG GGTTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCCTAACAGCGGTTATTC GAACATACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	20

Constructo	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
I-HHG	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCTAACAGCGGTTATGC CACGTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGAACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	22
I-HLA1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGITATAG TACCTACAGCCAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	24
I-HLA2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGITATAG TACCTACAACGAGAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	26
I-HLA3	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGITATA GTACCTACAGCCAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	28

Constructo	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
I-HLA4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGCTGGGCTGAGGTGA AGAACGCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGCA ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAAGTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTGGACACCGGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCCGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG GTGACCGTCTCCTCA	30
I-HLA5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCAGCTGGGCCAGAGGTGA AGAACGCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGTTATA TACCTACAGCCAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCCGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	32
I-HLA6	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCAGCTGGGCCAGAGGTGA AGAACGCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCTAACAGTGGTTATA TACCTACAACGAGAAAGTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCCGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	34
I-HLA7	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCAGCTGGGCCAGAGGTGA AGAACGCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCGCGGACAACGGCTCGA GTGGATCGGCTGGATCAATCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAAGTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCCTGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCCGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG GTGACCGTCTCCTCA	36

Constructo	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
I-HLA8	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAACCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATATTCAACCCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCAC CATTACCGCGAACAAATCCACGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGT TACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG CGTGACCGTCTCCTCA	38
I-HLA9	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAACCTGGCGAGTCGTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTCAATTCACTGACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTCAACCCTAACAGCGGTTATA TACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGAACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGT CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	40
I-HLA10	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAACCTGGCGAGTCGTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTCAATTCACTGACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGATGCCTGGAAAGGGCCTCGAG TGGATGGCTACTTCAATCCTAACAGTGGTTATA TACCTACGCCAAGCTTCAAGGCCAGGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGCGGT TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	120
Sequência de sinal VH	ATGGACTGGACCTGGAGGGATCCTCTTGGTGGC AGCAGCCACAGGAGCCCACACTCC	42
ICR62 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCATTCTGTCT GCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACTGCAA AGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTAAACTGGT ATCAGCAAAAGCTTGGAGAACAGCTCCAAACGCCT GATATATAACAAACAATTGCAAACAGGCATCC CATCAAGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGAT TACACACTCACCACATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA TTTGCCACATATTCTGCTTGCAGCATAATAGTT TCCCACGTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAACGTGA AACGTACG	44

Constructo	Sequência de Nucleotídeo	SEQ ID NO
I-KC	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGCGAGACCGGGTACCATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAACAATTACTAAATTGG TACCAGCAGAACGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGAGACAGGGCGTC CCATCAAGGTTCAGCGGGAGTGGATCCGGGACAG AATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTGCCACCTATTACTGCTTGAGCATAATAG TTTCCCACGTTGCCAGGGACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGT	46
Sequência de sinal VL	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCTGGGCCT CCTGCTGCTCTGGTCCCAGGTGCCAGGTGT	48
I-KA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGCGAGACCGGGTACCATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAACAATTACTAAATTGG TACCAGCAGAACGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGAGACAGGGCGTC CCATCAAGGTTCAGCGGGAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTGCCACCTATTACTGCTTGAGCATAATAG TTTCCCACGTTGCCAGGGACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGT	50
I-KB	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGCGAGACCGGGTACCATCACCTGCA AAGCAAGTCAGAATATTAAACAATTACTAAACTGG TACCAGCAGAACGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGAGACAGGGCGTC CCATCAAGGTTCAGCGGGAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTGCCACCTATTACTGCTTGAGCATAATAG TTTCCCACGTTGCCAGGGACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGT	52

Tabela 7

Constructo	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO
I-kr02 VH	QVNLLQSGAALVVKPQASVVLSCSKSDFPFDYKIHWVK QSHGKSLEWIGYFNPNNSGYSTYNEFKSKATLTADKSTD TAYMELTSLTSEDSATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGA SVTVSS	1
I-HHA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYAISWVR QAPGQGLEWMGGINPNNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	3
I-HHB	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSGFTFTDYKIHWVR QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	5

Constructo	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO
I-HHC	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSFTFTDYKIHWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	7
I-HLA	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYAQKFQGRVTMTADT</u> <u>SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	9
I-HLB	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSFTFTDYKIHWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSI</u> <u>STAYMELSRLRSDDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	11
I-HLC	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSFTFTDYKIHWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYNEKFKSRTMTADTSI</u> <u>STAYMELSRLRSDDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	13
I-HHD	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	15
I-HHE	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSFTFTDYKISWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	17
I-HHF	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSFTFTDYKIHWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	19
I-HHG	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKGSFTFTDYKIHWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYATYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	21
I-HLA1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSI</u> <u>STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	23
I-HLA2	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYNEKFQGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	25
I-HLA3	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSI</u> <u>STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	27
I-HLA4	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYNEKFQGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	29

Constructo	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO
I-HLA5	<u>QMQLVQSGPEVKPGTSVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSI</u> <u>STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTSS</u>	31
I-HLA6	<u>QMQLVQSGPEVKPGTSVKVSCKASGFTFTDYYMHWV</u> <u>RQAPGQGLEWMGWINPNNSGYSTYNEKFQGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTSS</u>	33
I-HLA7	<u>QMQLVQSGPEVKPGTSVKVSCKASGFTFTDYYKIHWR</u> <u>QARGQRLEWIGWINPNNSGYSTYNEKFQGQVTISADKSIS</u> <u>TAYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTSS</u>	35
I-HLA8	<u>QMQLVQSGPEVKPGTSVKVSCKASGFTFTDYYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTSS</u>	37
I-HLA9	<u>EVQLVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQ</u> <u>APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSPGGYYYVMDAWGQGT</u> <u>TVTVSS</u>	39
I-HLA10	<u>EVQLVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQ</u> <u>MPGKGLEWMGYFNPNSGYSTYSPSFQGQVTISADKSIST</u> <u>AYLQWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYYVMDAWGQGT</u> <u>TVTVSS</u>	121
Sequência de sinal VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	41
ICR62 VL	<u>DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINNYLNWYQQK</u> <u>LGEAPKRЛИYNNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP</u> <u>EDFATYFCLQHNSFPTFGAGTKLEIKRT</u>	43
I-KC	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQQK</u> <u>PGKAPKRЛИYNNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP</u> <u>EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKEIKRT</u>	45
Sequência de sinal VL	<u>MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC</u>	47
I-KA	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQQK</u> <u>PGKAPKRЛИYNNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQ</u> <u>PEDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKEIKRTV</u>	49
I-KB	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNINNYLNWYQQK</u> <u>PGKAPKRЛИYNNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQ</u> <u>PEDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKEIKRTV</u>	51

[0137] Em uma outra modalidade, a presente invenção é direcionada a um vetor de expressão e/ou uma célula hospedeira que compreendem um ou mais polinucleotídeos isolados da presente invenção.

[0138] Geralmente, qualquer tipo de linhagem de célula cultivada pode ser usado para expressar a ABM da presente invenção. Em uma modalidade preferida, células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 ou células de hibridoma, outras células mamíferas, células de levedura, células de inseto, ou células vegetais são usadas como a linha-

gem de célula de base para gerar as células hospedeiras engendradas da invenção.

[0139] A eficácia terapêutica das ABMs da presente invenção pode ser realçada produzindo-as em uma célula hospedeira que expressa ainda um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi. Em uma outra modalidade preferida, a expressão das ABMs da presente invenção em uma célula hospedeira que expressa um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII resulta em ABMs com afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada e função efetora aumentada. Consequentemente, em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a uma célula hospedeira compreendendo (a) um ácido nucléico isolado compreendendo uma sequência que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII; e (b) um polinucleotídeo isolado que codifica uma ABM da presente invenção, tal como um anticorpo quimérico, primatizado ou anticorpo que liga-se a EGFR humano. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio catalítico de GnTIII e o domínio de localização de Golgi é o domínio de localização de manosidase II. Métodos para gerar tais polipeptídeos de fusão e usá-los para produzir anticorpos com funções efetoras aumentadas são descritos no Ped. de Pat. Provisório U.S. Nº 60/495.142 e Publ. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2004/0241817 A1, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são expressamente incorporados aqui por referência. Em uma outra modalidade preferida, a ABM quimérica é um anticorpo quimérico ou um fragmento deste, tendo a especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato. Em uma modalidade particularmente preferida, o anticorpo quimérico compreende um

Fc humano. Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo é primatizado ou humanizado.

[0140] Em uma modalidade, um ou vários polinucleotídeos que codificam uma ABM da presente invenção podem ser expressados sob o controle de um promotor constitutivo ou, alternativamente, um sistema de expressão regulado. Os sistemas de expressão regulados adequados incluem, mas não são limitados a, um sistema de expressão regulado de tetraciclina, um sistema de expressão induzível por ecdisona, um sistema de expressão **lac-switch**, um sistema de expressão induzível por glicocorticóide, um sistema promotor induzível por temperatura, e um sistema de expressão induzível por metal metalotioneína. Se vários ácidos nucléicos diferentes que codificam uma ABM da presente invenção estão compreendidos dentro do sistema de célula hospedeira, alguns deles podem ser expressados sob o controle de um promotor constitutivo, enquanto outros são expressados sob o controle de um promotor regulado. O nível de expressão máximo é considerado ser o nível mais alto possível de expressão de polipeptídeo estável que não têm um efeito adverso significante na taxa de crescimento celular, e será determinado usando experimentação de rotina. Os níveis de expressão são determinados por métodos geralmente conhecidos na técnica, incluindo análise de Western blot usando um anticorpo específico para a ABM ou um anticorpo específico para um rótulo de peptídeo fundido à ABM; e análise de Northern blot. Em uma outra alternativa, o polinucleotídeo pode ser operativamente ligado a um gene repórter; os níveis de expressão de uma ABM quimérica (por exemplo, humanizada) tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato são determinados medindo-se um sinal correlacionado com o nível de expressão do gene repórter. O gene repórter pode ser transcrito juntamente com o(s) ácido(s) nucléico(s) que codifica(m) o dito polipeptídeo de fusão como uma única molécula

de mRNA; suas sequências de codificação respectivas podem ser ligadas por um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES) ou por um realçador de tradução independente do capuz (CITE). O gene repórter pode ser traduzido juntamente com pelo menos um ácido nucléico que codifica uma ABM quimérica (por exemplo, humanizada) tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato tal que uma única cadeia de polipeptídeo é formada. Os ácidos nucléicos que codificam as ABMs da presente invenção podem ser operativamente ligados ao gene repórter sob o controle de um único promotor, tal que o ácido nucléico que codifica o polipeptídeo de fusão e o gene repórter são transcritos em uma molécula de RNA que é alternativamente unida em duas moléculas de RNA mensageiro (mRNA) separadas; um dos mRNAs resultantes é traduzido na dita proteína repórter, e o outro é traduzido no dito polipeptídeo de fusão.

[0141] Métodos que são bem-conhecidos àqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo a sequência de codificação de uma ABM tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato junto com sinais de controle transcricionais/traducionais apropriados. Estes métodos incluem técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação *in vivo*/recombinação genética. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em Maniatis *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) e Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y (1989).

[0142] Uma variedade de sistemas de hospedeiro-vetor de expressão pode ser utilizada para expressar a sequência de codificação das ABMs da presente invenção. Preferivelmente, as células mamíferas são usadas como sistemas de célula hospedeira transfetados com vetores de expressão de DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo

recombinantes contendo a sequência de codificação da proteína de interesse e a sequência de codificação do polipeptídeo de fusão. O mais preferivelmente, as células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 ou células de hibridoma, outras células mamíferas, células de levedura, células de inseto, ou células vegetais são usadas como sistema de célula hospedeira. Alguns exemplos de sistemas de expressão e métodos de seleção são descritos nas referências seguintes, e referências nesta: Borth *et al.*, *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73 (2000-2001), em Werner *et al.*, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), em Andersen e Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), em Chadd e Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), e em Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). Em modalidades alternativas, outros sistemas de célula hospedeira eucarióticos podem ser usados, incluindo células de levedura transformadas com vetores de expressão de levedura recombinantes contendo a sequência de codificação de uma ABM da presente invenção, tais como os sistemas de expressão mostrados no Ped. de Pat. U.S. Nº 60/344.169 e WO 03/056914 (métodos para produzir glicoproteína semelhante à humana em uma célula hospedeira eucariótica não humana) (os conteúdos de cada um dos quais são incorporados por referência em sua totalidade); sistemas de célula de inseto infectada com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, baculovírus) contendo a sequência de codificação de uma ABM químérica tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato; sistemas de célula vegetal infectada com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformada com vetores de expressão de plasmídeo recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo a

sequência de codificação da ABM da invenção, incluindo, mas não limitados, aos sistemas de expressão mostrados na Pat. U.S. Nº 6.815.184 (métodos para a expressão e secreção de polipeptídeos biologicamente ativos de lentilha d'água geneticamente engendrada); WO 2004/057002 (produção de proteínas glicosiladas em células de planta briófita por introdução de um gene de glicosil transferase) e WO 2004/024927 (métodos de gerar proteína que não vegetal heteróloga extracelular em protoplasta de musgo); e Ped. de Pat. U.S. Nós 60/365.769, 60/368.047, e WO 2003/078614 (processamento de glicoproteína em plantas transgênicas compreendendo uma enzima de GnTIII mamífera funcional) (os conteúdos de cada um dos quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade); ou sistemas de célula animal infectada com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, adenovírus, vírus da vacínia) incluindo linhagens de célula engendradas para conter cópias múltiplas do DNA que codifica uma ABM quimérica tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato estavelmente ampliada (CHO/dhfr) ou instavelmente ampliada em cromossomos de duplo-minutos (por exemplo, linhagens de célula de murino). Em uma modalidade, o vetor compreendendo o(s) polinucleotídeo(s) que codifica(m) a ABM da invenção é policistrônico. Também, em uma modalidade a ABM debatida acima é um anticorpo ou um fragmento deste. Em uma modalidade preferida, a ABM é um anticorpo humanizado.

[0143] Para os métodos desta invenção, a expressão estável é a expressão transitória geralmente preferida porque ela tipicamente obtém resultados mais reproduzíveis e também é mais acessível à produção em grande escala. Ao invés de usar vetores de expressão que contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com os ácidos nucléicos de codificação respectivos controlados por elementos de controle de expressão apropriados (por

exemplo, promotor, realçador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável. A seguir da introdução do DNA estranho, as células engendradas podem ser deixadas crescer durante 1 a 2 dias em um meio enriquecido, e depois são mudadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite a seleção de células que estavelmente integraram o plasmídeo em seus cromossomos e crescem para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhagens de célula.

[0144] Vários sistemas de seleção podem ser usados, incluindo, mas não limitados, aos genes de timidina cinase do vírus do herpes simples (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223 (1977)), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), e de adenina fosforribosiltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22:817 (1980)), que podem ser utilizados em células tk-, hgprt- ou aprt-, respectivamente. Também, a resistência a antimetabolito pode ser usada como a base de seleção para genes dhfr, que confere resistência ao metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1989); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)); e hygro, que confere resistência à higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)). Recentemente, genes selecionáveis adicionais foram descritos, isto é, trpB, que permite que células utilizem indol no lugar de triptofano; hisD, que permite que células utilizem histinol no lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)); o sistema de glutamina sintase; e ODC (ornitina descarboxilase) que confere resistência ao inibidor de ornitina descarboxilase, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McCon-

logue, em: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

[0145] A presente invenção é direcionada ainda a um método para modificar o perfil de glicosilação das ABMs da presente invenção que são produzidas por uma célula hospedeira, compreendendo expressar na dita célula hospedeira um ácido nucléico que codifica uma ABM da invenção e um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo com atividade de GnTIII, ou um vetor compreendendo tais ácidos nucléicos. Preferivelmente, o polipeptídeo modificado é IgG ou um fragmento desta compreendendo a região Fc. Em uma modalidade particularmente preferida a ABM é um anticorpo humanizado ou um fragmento deste.

[0146] As ABMs modificadas produzidas pelas células hospedeiras da invenção exibem afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada e/ou função efetora aumentada como um resultado da modificação. Em uma modalidade particularmente preferida a ABM é um anticorpo humanizado ou um fragmento deste contendo a região Fc. Preferivelmente, a afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada é a ligação aumentada a um receptor de ativação de Fc γ , tal como o receptor de Fc γ RIIIa. A função efetora aumentada é preferivelmente um aumento em um ou mais dos seguintes: citotoxicidade celular aumentada dependente de anticorpo, fagocitose celular aumentada dependente de anticorpo (ADCP), secreção de citocina aumentada, captação de antígeno mediada por complexo imune aumentada por células que apresentam antígeno, citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada, ligação aumentada a células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada a células polimorfonucleares (PMNs), ligação aumentada a monócitos, reticulação aumentada de anticorpos ligados ao alvo, apoptose de indução de sinalização direta aumentada, maturação de célula dendrítica aumentada, e imprimação de célula T aumentada.

[0147] A presente invenção também é direcionada a um método para produzir uma ABM da presente invenção, tendo oligossacarídeos modificados em uma célula hospedeira compreendendo (a) cultivar uma célula hospedeira engendrada para expressar pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII sob condições que permitem a produção de uma ABM de acordo com a presente invenção, em que o dito polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é expressado em uma quantidade suficiente para modificar os oligossacarídeos na região Fc da dita ABM produzida pela dita célula hospedeira; e (b) isolar a dita ABM. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio catalítico de GnTIII. Em uma modalidade particularmente preferida, o polipeptídeo de fusão compreende ainda o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi.

[0148] Preferivelmente, o domínio de localização de Golgi é o domínio de localização de manosidase II ou GnTI. Alternativamente, o domínio de localização de Golgi é selecionado do grupo consistindo: no domínio de localização de manosidase I, no domínio de localização de GnTII, e no domínio de localização de uma fucosiltransferase de núcleo 1-6. As ABMs produzidas pelos métodos da presente invenção têm afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada e/ou função efetora aumentada. Preferivelmente, a função efetora aumentada é uma ou mais das seguintes: citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada (incluindo citotoxicidade celular aumentada dependente de anticorpo), fagocitose celular aumentada dependente de anticorpo (ADCP), secreção de citocina aumentada, captação de antígeno mediada por complexo imune aumentada por células que apresentam antígeno, ligação aumentada a células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada a monócitos, ligação aumentada a células polimorfonucleares, apoptose de indução de sinalização direta aumenta-

da, reticulação aumentada de anticorpos ligados ao alvo, maturação de célula dendrítica aumentada, ou impração de célula T aumentada. A afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada é preferivelmente ligação aumentada aos receptores de ativação de Fc tais como Fc γ RIIIa. Em uma modalidade particularmente preferida a ABM é um anticorpo humanizado ou um fragmento deste.

[0149] Em uma outra modalidade, a presente invenção é direcionada a uma ABM quimérica tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato produzido pelos métodos da invenção que tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos bifurcados na região Fc do dito polipeptídeo. É considerado que uma tal ABM abrange os anticorpos e fragmentos destes compreendendo a região Fc. Em uma modalidade preferida, a ABM é um anticorpo humanizado. Em uma modalidade, a porcentagem de oligossacarídeos bifurcados na região Fc da ABM é pelo menos 50 %, mais preferivelmente, pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, ou pelo menos 90 %, e o mais preferivelmente pelo menos 90 a 95 % dos oligossacarídeos totais. Ainda em uma outra modalidade, a ABM produzida pelos métodos da invenção tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos não fucosilados na região Fc como um resultado da modificação de seus oligossacarídeos pelos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, a porcentagem de oligossacarídeos não fucosilados é pelo menos 50 %, preferivelmente, pelo menos 60 % a 70 %, o mais preferivelmente pelo menos 75 %. Os oligossacarídeos não fucosilados podem ser do tipo híbrido ou complexo. Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM produzida pelas células hospedeiras e métodos da invenção tem uma proporção aumentada de oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados na região Fc. Os oligossacarídeos não fucosilados, bifurcados podem ser híbridos ou complexos. Especificamente, os métodos da presente invenção po-

dem ser usados para produzir ABMs em que pelo menos 15 %, mais preferivelmente pelo menos 20 %, mais preferivelmente pelo menos 25 %, mais preferivelmente pelo menos 30 %, mais preferivelmente pelo menos 35 % dos oligossacarídeos na região Fc da ABM são bifurcados, não fucosilados. Os métodos da presente invenção também podem ser usados para produzir polipeptídeos em que pelo menos 15 %, mais preferivelmente pelo menos 20 %, mais preferivelmente pelo menos 25 %, mais preferivelmente pelo menos 30 %, mais preferivelmente pelo menos 35 % dos oligossacarídeos na região Fc do polipeptídeo são híbridos bifurcados não fucosilados.

[0150] Em uma outra modalidade, a presente invenção é direcionada a uma ABM quimérica tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato engendrada para ter função efetora aumentada e/ou afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada, produzida pelos métodos da invenção. Preferivelmente, a função efetora aumentada é uma ou mais das seguintes: citotoxicidade celular mediada por Fc aumentada (incluindo citotoxicidade celular aumentada dependente de anticorpo), fagocitose celular aumentada dependente de anticorpo (ADCP), secreção de citocina aumentada, captação de antígeno mediada por complexo imune aumentada por células que apresentam antígeno, ligação aumentada a células NK, ligação aumentada a macrófagos, ligação aumentada a monócitos, ligação aumentada a células polimorfonucleares, apoptose de indução de sinalização direta aumentada, reticulação aumentada de anticorpos ligados ao alvo, maturação de célula dendrítica aumentada, ou impremiação de célula T aumentada. Em uma modalidade preferida, a afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada é a ligação aumentada a um receptor de ativação de Fc, o mais preferivelmente Fc γ RIIIa. Em uma modalidade, a ABM é um anticorpo, um fragmento de anticorpo contendo a região Fc, ou uma proteína de fusão que inclui uma região

equivalente à região Fc de uma imunoglobulina. Em uma modalidade particularmente preferida, a ABM é um anticorpo humanizado.

[0151] A presente invenção é direcionada ainda às composições farmacêuticas compreendendo as ABMs da presente invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0152] A presente invenção é direcionada ainda ao uso de tais composições farmacêuticas no método de tratamento do câncer. Especificamente, a presente invenção é direcionada a um método para o tratamento do câncer compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica da invenção.

[0153] A presente invenção fornece ainda métodos para a geração e uso de sistemas de célula hospedeira para a produção de glicofomas das ABMs da presente invenção, tendo afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada, preferivelmente ligação aumentada aos receptores de ativação de Fc, e/ou tendo funções efetoras aumentadas, incluindo citotoxicidade celular dependente de anticorpo. A metodologia de glicoengenharia que pode ser usada com as ABMs da presente invenção foi descrita em maior detalhe na Pat. U.S. Nº 6.602.684, Publ. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2004/0241817 A1, Publ. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2003/0175884 A1, Pedido de Patente U.S. Provisionário Nº 60/441.307 e WO 2004/065540, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são incorporados aqui por referência em sua totalidade. As ABMs da presente invenção alternativamente podem ser glicoengendradas para ter resíduos de fucose reduzidos na região Fc de acordo com as técnicas descritas na Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2003/0157108 (Genentech), ou em EP 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 e Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nºs 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa). Os conteúdos de cada um destes documentos são aqui incorporados por referência em suas totalidades. As ABMs glicoengendradas da inven-

ção também podem ser produzidas em sistemas de expressão que produzem glicoproteínas modificadas, tais como aquelas mostradas na Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 60/344.169 e WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) ou na WO 2004/057002 e WO 2004/024927 (Greenovation), os conteúdos de cada uma das quais são por meio desta incorporados por referência em sua totalidade.

Geração de Linhagens de Célula para a Produção de Proteínas Com Padrão de Glicosilação Alterado

[0154] A presente invenção fornece sistemas de expressão de célula hospedeira para a geração das ABMs da presente invenção tendo padrões de glicosilação modificados. Em particular, a presente invenção fornece sistemas de célula hospedeira para a geração de glicoformas das ABMs da presente invenção tendo um valor terapêutico melhorado. Portanto, a invenção fornece sistemas de expressão de célula hospedeira selecionados ou engendrados para expressar um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII. Em uma modalidade, o polipeptídeo tendo atividade de GnTIII é um polipeptídeo de fusão compreendendo o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo. Especificamente, tais sistemas de expressão de célula hospedeira podem ser engendrados para compreender uma molécula de ácido nucléico recombinante que codifica um polipeptídeo tendo GnTIII, operativamente ligado a um sistema promotor constitutivo ou regulado.

[0155] Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece uma célula hospedeira que foi engendrada para expressar pelo menos um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo de fusão tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo. Em um aspecto, a célula hospedeira é engendrada com uma molécula de ácido nucléico compreendendo pelo menos um gene que codifica um polipeptídeo de fusão

tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo.

[0156] Geralmente, qualquer tipo de linhagem de célula cultivada, incluindo as linhagens de célula debatidas acima, pode ser usado como um fundamento para engendrar as linhagens de célula hospedeira da presente invenção. Em uma modalidade preferida, as células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de camundongo P3X63, células PER, células PER.C6 ou células de hibridoma, outras células mamíferas, células de levedura, células de inseto, ou células vegetais são usadas como a linhagem de célula de base para gerar as células hospedeiras engendradas da invenção.

[0157] A invenção é considerada abranger quaisquer células hospedeiras engendradas que expressam um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII, incluindo um polipeptídeo de fusão que compreende o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo como definido aqui.

[0158] Um ou vários ácidos nucléicos que codificam um polipeptídeo tendo atividade de GnTIII podem ser expressados sob o controle de um promotor constitutivo ou, alternativamente, um sistema de expressão regulado. Tais sistemas são bem-conhecidos na técnica, e incluem os sistemas debatidos acima. Se vários ácidos nucléicos diferentes que codificam polipeptídeos de fusão tendo atividade de GnTIII e compreendendo o domínio de localização de Golgi de um polipeptídeo residente de Golgi heterólogo estão compreendidos dentro do sistema de célula hospedeira, alguns deles podem ser expressados sob o controle de um promotor constitutivo, enquanto outros são expressados sob o controle de um promotor regulado. Os níveis de expressão dos polipeptídeos de fusão tendo atividade de GnTIII são determinados por métodos geralmente conhecidos na técnica, incluindo análise

de Western blot, análise de Northern blot, análise de expressão de gene repórter ou medição da atividade de GnTIII. Alternativamente, uma lectina pode ser utilizada que liga-se aos produtos biossintéticos do GnTIII, por exemplo, E₄-PHA lectina. Alternativamente, um ensaio funcional que mede a ligação de receptor de Fc aumentada ou função efetora aumentada mediadas por anticorpos produzidos pelas células engendrada com o ácido nucléico que codifica um polipeptídeo com atividade de GnTIII pode ser usado.

Identificação de Transfектantes ou Transformantes que Expressam a Proteína Tendo um Padrão de Glicosilação Modificado

[0159] As células hospedeiras que contêm a sequência de codificação de uma ABM quimérica (por exemplo, humanizada) tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato e que expressa os produtos genéticos biologicamente ativos podem ser identificadas por pelo menos quatro métodos gerais; (a) hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA; (b) a presença ou ausência de funções de gene "marcador"; (c) avaliação do nível de transcrição como medido pela expressão dos transcritos de mRNA respectivos na célula hospedeira; e (d) detecção do produto genético como medido por imunoensaio ou por sua atividade biológica.

[0160] No primeiro método, a presença da sequência de codificação de uma ABM quimérica (por exemplo, humanizada) tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato e a sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII pode ser detectada por hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA usando sondas compreendendo sequências de nucleotídeo que são homólogas às sequências de codificação respectivas, respectivamente, ou porções ou derivados destes.

[0161] No segundo método, o sistema de vetor de expressão/hospedeiro recombinante pode ser identificado e selecionado com

base na presença ou ausência de certas funções de gene "marcador" (por exemplo, atividade de timidina cinase, resistência a antibióticos, resistência a metotrexato, fenótipo de transformação, formação de corpo de oclusão em baculovírus, etc.). Por exemplo, se a sequência de codificação da ABM da invenção, ou um fragmento desta, e a sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII forem inseridas dentro de uma sequência genética marcadora do vetor, recombinantes contendo as sequências de codificação respectivas podem ser identificados pela ausência da função de gene marcador. Alternativamente, um gene marcador pode ser colocado juntamente com as sequências de codificação sob o controle do mesmo promotor ou diferente usado para controlar a expressão das sequências de codificação. A expressão do marcador em resposta à indução ou seleção indica a expressão da sequência de codificação da ABM da invenção e da sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII.

[0162] No terceiro método, a atividade transcrional para a região de codificação da ABM da invenção, ou um fragmento desta, e a sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII pode ser avaliada por ensaios de hibridização. Por exemplo, o RNA pode ser isolado e analisado por Northern blot usando uma sonda homóloga às sequências de codificação da ABM da invenção, ou um fragmento desta, e às sequência de codificação do polipeptídeo tendo atividade de GnTIII ou porções particulares desta. Alternativamente, ácidos nucleicos totais da célula hospedeira podem ser extraídos e avaliados quanto à hibridização a tais sondas.

[0163] No quarto método, a expressão dos produtos de proteína pode ser avaliada imunologicamente, por exemplo por Western blots, imunoensaios tais como radioimuno-precipitação, imunoensaios ligados à enzima e similares. O teste elementar do sucesso do sistema de expressão, entretanto, envolve a detecção dos produtos

genéticos biologicamente ativos.

Geração e Uso de ABMs tendo Função Efetora Aumentada Incluindo Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo

[0164] Em modalidades preferidas, a presente invenção fornece glicoformas de ABMs químéricas (por exemplo, humanizadas) tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato e tendo função efetora aumentada incluindo citotoxicidade celular dependente de anticorpo. A engenharia de glicosilação de anticorpos foi previamente descrita. Ver por exemplo, Patente U.S. Nº 6.602.684, incorporada aqui por referência em sua totalidade.

[0165] Experiências clínicas de anticorpos monoclonais não conjugados (mAbs) para o tratamento de alguns tipos de câncer recentemente têm produzido resultados encorajadores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Uma IgG1 químérica, não conjugada foi aprovada quanto ao grau baixo ou linfoma que não de Hodgkin célula B folicular. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), enquanto um outro mAb não conjugado, uma IgG1 humanizada que alveja tumores de mama sólidos, também apresentaram resultados promissores em experiências clínicas de fase III. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Os抗ígenos destes dois mAbs são altamente expressados em suas células tumorosas respectivas e os anticorpos mediem destruição potente do tumor por células efetoras *in vitro* e *in vivo*. Ao contrário, muitos outros mAbs não conjugados com especificidades de tumor claras não podem provocar funções efetoras de potência suficiente a serem clinicamente úteis. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Para alguns destes mAbs mais fracos, a terapia com citocina adjunta está correntemente sendo testada. A adição de citocinas pode estimular a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) aumentando-se a

atividade e número de linfócitos circulantes. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). ADCC, um ataque lítico sobre células alvejadas em anticorpo, é provocado na ligação de receptores de leucócito à região constante (Fc) de anticorpos. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997).

[0166] Um método diferente, mas complementar, para aumentar a atividade de ADCC de IgG1s não conjugadas é engendrar a região Fc do anticorpo. Estudos de engenharia da proteína mostraram que Fc γ Rs interage com a região da dobradiça mais baixa do domínio CH2 de IgG. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996). Entretanto, a ligação de Fc γ R também requer a presença de oligossacarídeos covalentemente ligados no Asn 297 conservado na região CH2. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright e Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997), sugerindo que tanto o oligossacarídeo quanto o polipeptídeo contribuem diretamente para o sítio de interação ou que o oligossacarídeo é necessário para manter uma conformação de polipeptídeo CH2 ativa. A modificação da estrutura de oligossacarídeo portanto pode ser explorada como um meio para aumentar a afinidade da interação.

[0167] Uma molécula de IgG porta dois oligossacarídeos N-ligados em sua região Fc, um em cada cadeia pesada. Como qualquer glicoproteína, um anticorpo é produzido como uma população de glicoformas que compartilham a mesma cadeia de polipeptídeo principal mas têm oligossacarídeos diferentes ligados aos sítios de glicosilação. Os oligossacarídeos normalmente encontrados na região Fc de IgG sérica são do tipo biantenal complexo (Wormald *et al.*, *Biochemistry* 36:130-38 (1997), com um nível baixo de ácido siálico terminal e N-acetylglucosamina (GlcNAc) de bifurcação, e um grau variável de galactosilação terminal e fucosilação nuclear. Alguns estudos sugerem que a estrutura de carboidrato mínima necessária para a ligação de Fc γ R

encontra-se dentro do núcleo de oligossacarídeo. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

[0168] As linhagens de célula derivadas de camundongo ou hamster usadas na indústria e academia para a produção de mAbs terapêuticos não conjugados normalmente ligam os determinantes de oligossacarídeo necessários aos sítios de Fc. As IgGs expressadas nestas linhagens de célula carecem, entretanto, do GlcNAc bifurcado encontrado em quantidades baixas em IgGs séricas. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Ao contrário, foi recentemente observado que uma IgG1 humanizada, produzida por mieloma de rato (CAMPATH-1H) portou um GlcNAc bifurcado em algumas de suas glicoformas. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). O anticorpo derivado por célula de rato atingiu uma atividade de ADCC *in vitro* máxima similar como anticorpos de CAMPATH-1H produzidos em linhagens de célula padrão, mas em concentrações de anticorpo显著mente mais baixas.

[0169] O antígeno de CAMPATH normalmente está presente em níveis altos em células de linfoma, e este mAb quimérico tem atividade de ADCC alta na ausência de um GlcNAc bifurcado. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). No caminho de glicosilação N-ligado, um GlcNAc bifurcado é adicionado por GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

[0170] Estudos prévios usaram uma única linhagem de célula CHO que produz anticorpo, que foi previamente engendrada para expressar, em uma forma externamente regulada, níveis diferentes de uma enzima do gene GnTIII clonado (Umaña, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Este método estabeleceu pela primeira vez uma correlação rigorosa entre a expressão de GnTIII e a atividade de ADCC do anticorpo modificado. Assim, a invenção considera um anticorpo quimérico, recombinante ou um fragmento deste com a es-

pecificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato, tendo glicosilação alterada que resulta de atividade de GnTIII aumentada. A atividade de GnTIII aumentada resulta em um aumento na porcentagem de oligosacarídeos bifurcados, assim como uma diminuição na porcentagem de resíduos de fucose, na região Fc da ABM. Este anticorpo, ou fragmento deste, tem afinidade de ligação do receptor de Fc aumentada e função efetora aumentada. Além disso, a invenção é direcionada ao fragmento de anticorpo e proteínas de fusão compreendendo uma região que é equivalente à região Fc de imunoglobulinas. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é humanizado.

Aplicações Terapêuticas de ABMs Produzidas de Acordo com os Métodos da Invenção.

[0171] No sentido mais amplo, as ABMs da presente invenção podem ser células alvo usadas *in vivo* ou *in vitro* que expressam EGFR. As células que expressam EGFR podem ser alvejadas para propósitos de diagnóstico ou terapêuticos. Em um aspecto, as ABMs da presente invenção podem ser usadas para detectar a presença de EGFR em uma amostra. Em um outro aspecto, as ABMs da presente invenção podem ser usadas para inibir ou reduzir a transdução de sinal mediada por EGFR em células que expressam EGFR na superfície. EGFR é anormalmente expressado (por exemplo, superexpressado) em muitos tumores humanos comparados ao tecido que não de tumor do mesmo tipo celular. Assim, as ABMs da invenção são particularmente úteis na prevenção de formação de tumor, erradicação de tumores e inibição do crescimento de tumor. Bloqueando-se a ligação de ligandos de EGFR a EGFR, as ABMs da invenção inibem a ativação de célula tumorosa dependente de EGF, incluindo fosforilação de tirosina de EGFR, taxa de acidificação extracelular aumentada, e proliferação de célula. As ABMs da invenção também agem para parar o ciclo celular, causam apoptose das células alvo (por exemplo, células tumorosas), e

inibem a angiogênese e/ou diferenciação de células alvo. As ABMs da invenção podem ser usadas para tratar qualquer tumor que expressa EGFR. Malignidades particulares que podem ser tratadas com as ABMs da invenção incluem, mas são não limitadas a, carcinomas de célula epidérmica e escamosa, carcinomas pulmonares de célula não pequena, gliomas, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer da próstata, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer da cabeça e pescoço, e carcinomas de célula renal.

[0172] As ABMs do presente podem ser usadas sozinhas para alvejar e matar células tumorosas *in vivo*. As ABMs também podem ser usadas em combinação com um agente terapêutico apropriado para tratar o carcinoma humano. Por exemplo, as ABMs podem ser usadas em combinação com métodos de tratamento padrão ou convencionais tais como quimioterapia, terapia por radiação ou podem ser conjugadas ou ligadas a um fármaco terapêutico, ou toxina, assim como a uma linfocina ou um fator de crescimento inibitório de tumor, para a liberação do agente terapêutico ao sítio do carcinoma. Os conjugados das ABMs desta invenção que são de capital importância são (1) imunotoxinas (conjugados da ABM e uma porção citotóxica) e (2) ABMs rotuladas (por exemplo radiorrotulada, rotulada com enzima, ou rotulada com fluorocromo) em que o rótulo fornece um meio para identificar complexos imunes que incluem a ABM rotulada. As ABMs também podem ser usadas para induzir a lise através do processo de complemento natural, e para interagir com células citotóxicas dependentes de anticorpo normalmente presentes.

[0173] A porção citotóxica da imunotoxina pode ser um fármaco citotóxico ou uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana ou vegetal, ou um fragmento enzimaticamente ativo ("cadeia A") de uma tal toxina. As toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas usados são fragmentos ativos que não ligam-se à cadeia A de difteria

da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina proteínas, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, e enomicina. Em uma outra modalidade, as ABMs são conjugadas a fármacos anti-câncer de molécula pequena. Os conjugados da ABM e tais porções citotóxicas são fabricados usando uma variedade de agentes de ligação de proteína bifuncionais. Os exemplos de tais reagentes são SPDP, IT, derivados bifuncionais de imidoésteres um tal HCl de adipimidato de dimetila, ésteres ativos tais como suberato de dissuccinimida, aldeídos tais como glutaraldeído, compostos de bis-azido tais como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados de bis-diazônio tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina, diisocianatos tais como 2,6-diisocianato de tolileno, e compostos de flúor bis-ativo tais como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno. A porção de lise de uma toxina pode ser unida ao fragmento Fab das ABMs. Toxinas apropriadas adicionais são conhecidas na técnica, como evidenciado por exemplo, no Pedido de Patente U.S. publicado Nº 2002/0128448, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[0174] Em uma modalidade, uma ABM químérica (por exemplo, humanizada), glicoengendrada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato, é conjugada à cadeia A de ricina. O mais vantajosamente, a cadeia A de ricina é desglicosilada e produzida através de meios recombinantes. Um método vantajoso de fabricar a imunotoxina ricina é descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238, 1098 (1987), por meio desta incorporado por referência.

[0175] Quando usados para matar células cancerosas humanas *in vitro* para propósitos de diagnóstico, os conjugados tipicamente serão

adicionados ao meio de cultura celular em uma concentração de pelo menos cerca de 10 nM. A formulação e modo de administração para o uso *in vitro* são não críticos. Formulações aquosas que são compatíveis com o meio de cultura ou perfusão normalmente serão usadas. A citotoxicidade pode ser lida por técnicas convencionais para determinar a presença ou grau do câncer.

[0176] Como debatido acima, um radiofarmacêutico citotóxico para tratar câncer pode ser fabricado conjugando-se um isótopo radioativo (por exemplo, I, Y, Pr) a uma ABM quimérica, glicoengendrada tendo substancialmente a mesma especificidade de ligação do anticorpo ICR62 de rato. O termo "porção citotóxica" como aqui usado é intencionado a incluir tais isótopos.

[0177] Em uma outra modalidade, os lipossomos são enchidos com um fármaco citotóxico e os lipossomos são revestidos com as ABMs da presente invenção. Porque existem muitas moléculas de EGFR na superfície da célula maligna que expressa EGFR, este método permite a liberação de quantidades grandes de fármaco ao tipo celular correto.

[0178] As técnicas para conjugar tais agentes terapêuticos aos anticorpos são bem-conhecidas (ver, por exemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), páginas 475-506 (1985); e Thorpe *et al.*, "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

[0179] Ainda outras aplicações terapêuticas para as ABMs da invenção incluem conjugação ou ligação, por exemplo, por técnicas de DNA recombinante, a uma enzima capaz de converter um pró-fármaco em um fármaco citotóxico e o uso deste conjugado de anticorpo-enzima em combinação com o pró-fármaco para converter o pró-fármaco a um agente citotóxico no sítio do tumor (ver, por exemplo, Senter *et al.*, "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792 (1989); e Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Method to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4:188-193 (1990)).

[0180] Ainda um outro uso terapêutico para as ABMs da invenção envolve o uso, não conjugado, na presença de complemento, ou como parte de um conjugado de anticorpo-fármaco ou anticorpo-toxina, para remover as células tumorosas da medula óssea de pacientes com câncer. De acordo com este método, a medula óssea autóloga pode ser purgada *ex vivo* por tratamento com o anticorpo e a medula infundida de volta no paciente [ver, por exemplo, Ramsay *et al.*, "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8(2):81-88 (1988)].

[0181] Além disso, é considerado que a invenção compreenda uma imunotoxina de cadeia única compreendendo domínios de ligação de antígeno que permitem substancialmente a mesma especificidade de ligação como o anticorpo ICR62 de rato (por exemplo, polipeptídeos compreendendo as CDRs do anticorpo ICR62 de rato) e compreendendo ainda um polipeptídeo de toxina. As imunotoxinas de cadeia única da invenção podem ser usadas para tratar carcinoma humano *in vivo*.

[0182] Similarmente, uma proteína de fusão compreendendo pelo menos a região de ligação de antígeno de uma ABM da invenção unida a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma segunda proteína tendo atividade antitumor, por exemplo, um linfocina ou oncostatina, pode ser usada para tratar carcinoma humano *in vivo*.

[0183] A presente invenção fornece um método para matar seletivamente células tumorosas que expressam EGFR. Este método compreende reagir o imunoconjungado (por exemplo, a imunotoxina) da invenção com as ditas células tumorosas. Estas células tumorosas podem ser de um carcinoma humano.

[0184] Adicionalmente, esta invenção fornece um método de tratar carcinomas (por exemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Este método compreende administrar a um paciente uma quantidade farmaceuticamente eficaz de uma composição contendo pelo menos um dos imunoconjungados (por exemplo, a imunotoxina) da invenção.

[0185] Em um outro aspecto, a invenção é direcionada a um método melhorado para tratar distúrbios de proliferação de célula em que EGFR é expressado, particularmente em que EGFR é, anormalmente expressado (por exemplo superexpressado), incluindo cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, pele, e rim, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ABM da presente invenção a um paciente humano em necessidade deste. Em uma modalidade preferida, a ABM é um anticorpo anti-EGFR glicoengendrado com uma especificidade de ligação substancialmente a mesma como aquela do anticorpo ICR62 de rato. Em uma outra modalidade preferida o anticorpo é humanizado. Os exemplos de distúrbios de proliferação de célula que podem ser tratados por uma ABM da presente invenção incluem, mas não são limitados a neoplasmas localizados no: abdômen, osso, mama, sistema digestivo, fígado, pâncreas, peritônio, glândulas endócri-

nas (adrenal, paratireóide, glândula pituitária, testículos, ovário, timo, tireóide), olho, cabeça e pescoço, sistema nervoso (central e periférico), sistema linfático, pélvico, pele, tecido mole, baço, região torácica, e sistema urogenital.

[0186] Similarmente, outros distúrbios de proliferação de célula também podem ser tratados pelas ABMs da presente invenção. Os exemplos de tais distúrbios de proliferação de célula incluem, mas não são limitados a: hipergamaglobulinemia, distúrbios linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidose, Síndrome de Sezary, Macro-globulinemia de Waldenström, Doença de Gaucher, histiocitose, e qualquer outra doença de proliferação de célula, além de neoplasia, localizada em um sistema de órgão listado acima.

[0187] De acordo com a prática desta invenção, o paciente pode ser um ser humano, pacientes equinos, porcinos, bovinos, murinos, caninos, felinos, e aviários. Outros animais de sangue quente também são incluídos nesta invenção.

[0188] A invenção objeto fornece ainda métodos para inibir o crescimento de células tumorosas humanas, tratando um tumor em um paciente, e tratando uma doença tipo proliferativa em um paciente. Estes métodos compreendem administrar ao paciente uma quantidade eficaz da composição da invenção.

[0189] A invenção é direcionada ainda aos métodos para tratar doenças ou distúrbios não malignos em um mamífero caracterizado por ativação ou produção anormais de EGFR ou um ou mais ligandos de EGFR, compreendendo administrar ao mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz das ABMs da invenção. O paciente geralmente terá células que expressam EGFR, por exemplo no tecido doente deste, tal que as ABMs da invenção são capazes para ligar-se às células dentro do paciente.

[0190] A ativação ou expressão anormais de EGFR ou um ligando

de EGFR podem estar ocorrendo nas células do paciente, por exemplo no tecido doente do paciente. A ativação anormal de EGFR pode ser atribuível à amplificação, superexpressão ou produção aberrante do EGFR e/ou ligando de EGFR. Em uma modalidade da invenção, um ensaio de diagnóstico ou prognóstico será realizado para determinar se a produção ou ativação anormais de EGFR (ou ligando de EGFR) está ocorrendo no paciente. Por exemplo, a amplificação de gene e/ou superexpressão de EGFR e/ou ligando podem ser determinadas. Vários ensaios para determinar tal amplificação/superexpressão estão disponíveis na técnica e incluem os ensaios IHC, FISH e ensaios de antígeno livre descritos acima. Alternativa, ou adicionalmente, níveis de um ligando de EGFR, tal como TGF- α em ou associado com a amostra pode ser determinado de acordo com procedimentos conhecidos. Tais ensaios podem detectar a proteína e/ou ácido nucléico que o codifica na amostra a ser testada. Em uma modalidade, os níveis de ligando de EGFR em uma amostra podem ser determinados usando imunoistoquímica (IHC); ver, por exemplo, Scher *et al.* *Clin. Cancer Research* 1:545-550 (1995). Alternativa, ou adicionalmente, uma pessoa pode avaliar níveis de ácido nucléico que codifica EGFR na amostra a ser testada; por exemplo por intermédio de técnicas de FISH, southern blotting, ou PCR.

[0191] Além disso, a superexpressão ou amplificação de EGFR ou ligando de EGFR podem ser avaliadas usando um ensaio de diagnóstico *in vivo*, por exemplo administrando-se uma molécula (tal como um anticorpo) que liga-se à molécula a ser detectada e é rotulada com um rótulo detectável (por exemplo um isótopo radioativo) e mapeando externamente o paciente para a localização do rótulo.

[0192] Alternativamente, uma pessoa pode detectar heterodímeros de EGFR, especialmente heterodímeros de EGFR-ErbB2, EGFR-ErbB3 ou EGFR-ErbB4, no paciente, por exemplo no tecido doente

deste, antes da terapia. Vários métodos para detectar interações proteína-proteína não covalentes ou de outro modo indicar a proximidade entre as proteínas de interesse estão disponíveis. Métodos exemplares para detectar os heterodímeros de EGFR incluem, sem limitação, métodos com base em imunoafinidade, tais como imunoprecipitação; transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) (Selvin, *Nat. Struct. Biol.* 7:730-34 (2000); Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.* 129:1543-58 (1995); e Nagy *et al.*, *Cytometry* 32:120-131 (1998)); co-localização de EGFR com ErbB2 ou ErbB3 usando técnicas de imuno-fluorescência direta ou indireta padrão e microscopia de varredura a laser confocal; imageamento de varredura a laser (LSI) para detectar a ligação do anticorpo e co-localização de EGFR com ErbB2 ou ErbB3 em uma formato de rendimento alto, tal como uma placa de microcavidades (Zuck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11122-11127 (1999)); ou sistema de ensaio eTag/m (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif.; e Pedido de Patente U.S. 2001/0049105, publicado em 6 de Dez. de 2001).

[0193] Portanto, é evidente que a presente invenção abrange composições farmacêuticas, combinações e métodos para tratar malignidades humanas tais como cânceres da bexiga, cérebro, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, mama, ovário, cólon, próstata, pele, e rim. Por exemplo, a invenção inclui composições farmacêuticas para o uso no tratamento de malignidades humanas compreendendo uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um anticorpo da presente invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0194] As composições de ABM da invenção podem ser administradas usando modos convencionais de administração incluindo, mas não limitados a, administração intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática ou diretamente no tumor. A administração intravenosa é preferida.

[0195] Em um aspecto da invenção, formulações terapêuticas contendo as ABMs da invenção são preparadas para o armazenamento misturando-se um anticorpo tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis opcionais (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes, ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações utilizadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; preservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal tais como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tais como TWEEN[®], PLURONICS[®] ou polietileno glicol (PEG).

[0196] As ABMs da presente invenção podem ser administradas a um paciente para tratar uma doença ou distúrbio caracterizados por EGFR anormal ou atividade de ligando de EGFR, tal como um tumor, sozinho ou em terapia de combinação com, por exemplo, um agente quimioterapêutico e/ou terapia por radiação. As formulações de anticorpo anti-EGFR exemplares são descritas em Herbst e Shen, *Cancer*

94(5):1593-1611. Os agentes quimioterapêuticos adequados incluem cisplatina, doxorrubicina, topotecano, paclitaxel, vimblastina, carboplatina, e etoposídeo.

[0197] As formulações liofilizadas adaptadas para a administração subcutânea são descritas na WO97/04801. Tais formulações liofilizadas podem ser reconstituídas com um diluente adequado a uma concentração de proteína elevada e a formulação reconstituída pode ser administrada subcutaneamente ao mamífero a ser tratado aqui.

[0198] A formulação aqui também pode conter mais do que um composto ativo conforme necessário para a indicação particular que é tratada, preferivelmente aquelas com atividades complementares que não afetam adversamente uma à outra. Por exemplo, pode ser desejável fornecer ainda um agente citotóxico, agente quimioterapêutico, citoquina ou agente imunossupressor (por exemplo um que age em células T, tal como ciclosporina ou um anticorpo que liga-se às células T, por exemplo, um que liga-se a LFA-1). A quantidade eficaz de tais outros agentes depende da quantidade de antagonista presente na formulação, do tipo de doença ou distúrbio ou tratamento, e outros fatores debatidos acima. Estes são geralmente usados nas mesmas dosagens e com vias de administração como usado mais acima ou cerca de 1 a 99 % das dosagens utilizadas até agora.

[0199] Os ingredientes ativos também podem ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacílico), respectivamente, em sistemas de liberação de fármaco coloidal (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980).

[0200] Preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Os exemplos adequados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o antagonista, matrizes estas que estão na forma de artigos formados, por exemplo, películas, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactidas (Pat. U.S. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinila não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como o LUPRON DE-POTTM (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0201] As formulações a serem usadas para a administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis.

[0202] As composições da invenção podem estar em uma variedade de formas de dosagem que incluem, mas não são limitadas a, soluções líquidas ou suspensão, comprimidos, pílulas, pós, supositórios, microcápsulas ou microbolhas poliméricas, lipossomos, e soluções injetáveis ou infusíveis. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

[0203] As composições da invenção também incluem preferivelmente veículos e adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis convencionais conhecidos na técnica tais como albumina sérica humana, trocadores de íon, alumina, lecitina, substâncias tampão tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, e sais ou eletrólitos tais como sulfato de protamina.

[0204] O modo mais eficaz de administração e regime de dosagem para as composições farmacêuticas desta invenção depende da seve-

ridade e curso da doença, da saúde do paciente e resposta ao tratamento e do julgamento do médico. Consequentemente, as dosagens das composições devem ser tituladas para o paciente individual. Não obstante, uma dose eficaz das composições desta invenção geralmente estará na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 2000 mg/kg. Em uma modalidade, a dose eficaz está na faixa de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 15,0 mg/kg. Em uma modalidade mais específica, a dose está na faixa de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. Em outras modalidades, a dose está na faixa de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg, ou de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. A dose da presente invenção também pode ser qualquer dose dentro destas faixas, incluindo, mas não limitadas a, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg, ou 15,0 mg/kg.

[0205] As moléculas descritas aqui podem estar em uma variedade de formas de dosagem que incluem, mas não são limitadas a, soluções líquidas ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, supositórios, microcápsulas ou microbolhas poliméricas, lipossomos, e soluções injetáveis ou infusíveis. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

[0206] As dosagens da presente invenção, em alguns casos, pode ser determinada pelo uso de biomarcadores prognosticáveis. Biomarcadores de prognóstico são marcadores moleculares que são usados para determinar (isto é, observar e/ou quantificar) um padrão de expressão e/ou ativação de genes ou proteínas relacionados ao tumor, ou componentes celulares de uma via de sinalização relacionada ao tumor. Esclarecendo os efeitos biológicos de terapias alvejadas no te-

cido tumoroso e correlacionando estes efeitos com a resposta clínica ajuda a identificar as vias de crescimento e sobrevivência predominantes operantes em tumores, estabelecendo deste modo um perfil de respondedores prováveis e fornecendo reciprocamente uma lógica para designar estratégias para resistência de superação. Por exemplo, biomarcadores para a terapia anti-EGFR podem compreender moléculas que estão na via de sinalização a jusante de EGFR que leva a um distúrbio de proliferação de célula incluindo, mas não limitado a, Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 (Mitchell, *Nature Biotech.* 22: 363-364 (2004); Becker, *Nature Biotech* 22:15-18 (2004); Tsao e Herbst, *Signal* 4:4-9 (2003)). Os biomarcadores para terapia anti-EGFR também podem compreender receptores do fator de crescimento tais como EGFR, ErbB-2 (HER2/neu), e ErbB-3 (HER3), e podem ser prognosticadores positivos ou negativos da resposta do paciente à terapia anti-EGFR. Por exemplo, o receptor do fator de crescimento ErbB-3 (HER3) foi determinado ser um biomarcador prognosticável negativo para o anticorpo anti-EGFR ABX-EGF (Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2004/0132097 A1).

[0207] Os biomarcadores de prognóstico podem ser medidos por ensaios celulares que são bem-conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a ensaios de imunoistoquímica, citometria de fluxo, imunofluorescência, captura-e-detecção, e ensaios de fase reversa, e/ou ensaios apresentados na Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2004/0132097 A1, os conteúdos inteiros das quais são aqui incorporados por referência. Os biomarcadores de prognóstico da terapia anti-EGFR, por si só, podem ser identificados de acordo com as técnicas apresentadas na Pub. do Ped. de Pat. U.S. Nº 2003/0190689A1, os conteúdos inteiros da qual são por meio desta incorporados por referência.

[0208] Em um aspecto, a presente invenção leva em consideração um método para tratar um distúrbio relacionado a EGFR comprehen-

dendo prognosticar uma resposta à terapia anti-EGFR em um paciente humano em necessidade de tratamento avaliando-se uma amostra do paciente humano antes da terapia com um ou uma pluralidade de reagentes que detectam a expressão e/ou ativação de biomarcadores prognosticáveis para um distúrbio relacionado a EGFR tal como câncer; determinar um padrão de expressão e/ou ativação de um ou mais dos biomarcadores prognosticáveis, em que o padrão prognostica a resposta do paciente humano à terapia anti-EGFR; e administrar a um paciente humano que é prognosticado a responder positivamente ao tratamento com anti-EGFR uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo uma ABM da presente invenção. Como aqui usado, um paciente humano que é prognosticado a responder positivamente ao tratamento com anti-EGFR é um para quem o anti-EGFR terá um efeito mensurável no distúrbio relacionado a EGFR (por exemplo, regressão/encolhimento do tumor) e para quem os benefícios da terapia anti-EGFR não são superados por efeitos adversos (por exemplo, toxicidade). Como aqui usado, uma amostra significa qualquer amostra biológica de um organismo, particularmente um ser humano, compreendendo uma ou mais células, incluindo células únicas de qualquer origem, amostras de tecido ou biópsia que foram removidas de órgãos tais como mama, pulmão, trato gastrointestinal, pele, cérvix, ovário, próstata, rim, cérebro, cabeça e pescoço, ou qualquer outro órgão ou tecido do corpo, e outras amostras corporais incluindo, mas não limitadas a, esfregaços, saliva, secreções, fluido cerebroespinal, bile, sangue, fluido linfático, urina e fezes.

[0209] A composição compreendendo uma ABM da presente invenção será formulada, dosada, e administrada em uma forma compatível com boa prática médica. Os fatores para a consideração neste contexto incluem a doença ou distúrbio particulares sendo tratados, o mamífero particular que é tratada, a condição clínica do paciente indi-

vidual, a causa da doença ou distúrbio, o sítio de liberação do agente, o método de administração, o programa de administração, e outros fatores conhecidos aos médicos. A quantidade terapeuticamente eficaz do antagonista a ser administrado será administrada por tais considerações.

[0210] Como uma proposta geral, a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo administrada parenteralmente por dose será na faixa de cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal do paciente por dia, com a faixa inicial típica de antagonista usada estando na faixa de cerca de 2 a 10 mg/kg. Em uma modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz está na faixa de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 15,0 mg/kg. Em uma modalidade mais específica, a dose está na faixa de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. Em outras modalidades, a dose está na faixa de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg, ou de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. A dose da presente invenção também pode ser qualquer dose dentro destas faixas, incluindo, mas não limitadas a, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg, ou 15,0 mg/kg.

[0211] Em uma modalidade preferida, a ABM é um anticorpo, preferivelmente um anticorpo humanizado. Dosagens adequadas para um tal anticorpo não conjugado estão, por exemplo, na faixa de cerca de 20 mg/m² a cerca de 1000 mg/m². Por exemplo, uma pessoa pode administrar ao paciente uma ou mais doses de substancialmente menos do que 375 mg/m² do anticorpo, por exemplo, onde a dose está na faixa de cerca de 20 mg/m² a cerca de 250 mg/m², por exemplo de cerca de 50 mg/m² a cerca de 200 mg/m².

[0212] Além disso, uma pessoa pode administrar uma ou mais doses iniciais do anticorpo seguido por uma ou mais doses subsequentes, em que a dose em mg/m² do anticorpo na(s) dose(s) subsequente(s) excede a dose em mg/m² do anticorpo na(s) dose(s) inicial(is). Por exemplo, a dose inicial pode estar na faixa de cerca de 20 mg/m² a cerca de 250 mg/m² (por exemplo, de cerca de 50 mg/m² a cerca de 200 mg/m²) e a dose subsequente pode estar na faixa de cerca de 250 mg/m² a cerca de 1000 mg/m².

[0213] Como observado acima, entretanto, estas quantidades sugeridas de ABM estão sujeitas consideravelmente à discrição terapêutica. O fator chave em selecionar uma dose e programa apropriados é o resultado obtido, como indicado acima. Por exemplo, doses relativamente mais altas podem ser necessárias inicialmente para o tratamento de doenças crônicas e agudas. Para obter os resultados mais eficazes, dependendo da doença ou distúrbio, o antagonista é administrado tão próximo ao primeiro sinal, diagnose, aparecimento, ou ocorrência da doença ou distúrbio quanto possível ou durante remissões da doença ou distúrbio.

[0214] No caso dos anticorpos anti-EGFR usados para tratar tumores, resultados terapêuticos ideais geralmente foram obtidos com uma dose que é suficiente para saturar completamente os receptores de EGF nas células alvo. A dose necessária para obter a saturação dependerá do número de receptores de EGF expressados por célula tumorosa (que pode variar显著mente entre tipos de tumor diferentes). Concentrações séricas tão baixas quanto 30 nM foram eficazes no tratamento de alguns tumores, enquanto concentrações acima de 100 nM podem ser necessárias para obter efeito terapêutico ideal com outros tumores. A dose necessária para obter saturação para um tumor dado pode ser facilmente determinada *in vitro* por radioimunoensaio ou imunoprecipitação.

[0215] Em geral, para a terapia de combinação com radiação, um regime terapêutico adequado envolve oito infusões semanais de uma ABM anti-EGFR da invenção em uma dose de carga de 100 a 500 mg/m² seguido por doses de manutenção a 100 a 250 mg/m² e radiação na quantidade de 70,0 Gy em uma dose de 2,0 Gy diariamente. Para a terapia de combinação com quimioterapia, um regime terapêutico adequado envolve administrar uma ABM anti-EGFR da invenção como doses de carga/manutenção semanais de 100/100 mg/m², 400/250 mg/m², ou 500/250 mg/m² em combinação com cisplatina em uma dose de 100 mg/m² a cada três semanas. Alternativamente, genticabina ou irinotecano podem ser usados no lugar de cisplatina.

[0216] A ABM da presente invenção é administrada por quaisquer meios adequados, incluindo administração parenteral, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, e, se desejado para tratamento imunossupressor local, intralesional. As infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, ou subcutânea. Além disso, o antagonista pode ser adequadamente administrado por infusão em pulso, por exemplo, com doses em declínio do antagonista. Preferivelmente a dosagem é fornecida por injeções, o mais injeções preferivelmente intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte de se a administração for breve ou crônica.

[0217] Uma pessoa pode administrar outros compostos, tais como agente citotóxicos, agentes quimioterapêuticos, agentes imunossupressores e/ou citocinas com os antagonistas aqui. A administração combinada inclui coadministração, usando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva em qualquer ordem, em que preferivelmente existe um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente suas atividades biológicas.

[0218] Estaria claro que a dose da composição da invenção necessária para obter curas pode ser reduzida ainda com a otimização da programação.

[0219] De acordo com a prática da invenção, o veículo farmacêutico pode ser um veículo de lipídeo. O veículo de lipídeo pode ser um fosfolipídeo. Além disso, o veículo de lipídeo pode ser um ácido graxo. Também, o veículo de lipídeo pode ser um detergente. Como aqui usado, um detergente é qualquer substância que altera a tensão de superfície de um líquido, geralmente diminuindo-a.

[0220] Em um exemplo da invenção, o detergente pode ser um detergente não iônico. Os exemplos de detergentes não iônicos incluem, mas não são limitados a, polisorbato 80 (também conhecido como Tween 80 ou (monooleato de polioxietilenossorbitano), Brij, e Triton (por exemplo Triton WR-1339 e Triton A-20).

[0221] Alternativamente, o detergente pode ser um detergente iônico. Um exemplo de um detergente iônico inclui, mas não é limitado a, brometo de alquiltrimetilamônio.

[0222] Adicionalmente, de acordo com a invenção, o veículo de lipídeo pode ser um lipossomo. Como usado neste pedido de patente, um "lipossomo" é qualquer vesícula ligada à membrana que contém quaisquer moléculas da invenção ou combinações destas.

[0223] Ainda em uma outra modalidade, a invenção refere-se a uma ABM de acordo com a presente invenção para o uso como um medicamento, em particular para o uso no tratamento ou profilaxia de câncer ou para o uso em uma condição pré-cancerosa ou lesão. O câncer pode ser, por exemplo, câncer pulmonar, câncer pulmonar de célula não pequena (NSCL), câncer pulmonar de célula bronquioalveolar, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer da cabeça ou pescoço, melanoma cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer estoma-

cal, câncer gástrico, câncer do cólon, câncer de mama, câncer uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, Doença de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer da próstata, câncer da bexiga, câncer do rim ou ureter, carcinoma de célula renal, carcinoma da pelve renal, mesotelioma, câncer hepatocelular, câncer biliar, leucemia crônica ou aguda, linfomas linfocíticos, neoplasmas do sistema nervoso central (CNS), tumores do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwanomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de célula escamosa, adenomas da glândula pituitária, incluindo versões refratárias de qualquer um dos cânceres acima, ou uma combinação de um ou mais dos cânceres acima. A condição pré-cancerosa ou lesão inclui, por exemplo, o grupo consistindo em leucoplaquia oral, ceratose actínica (ceratose solar), pólipos pré-cancerosos do cólon ou reto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de câncer do cólon que não polipose hereditária (HNPCC), esôfago de Barrett, displasia da bexiga, e condições cervicais pré-cancerosas.

[0224] Preferivelmente, o dito câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer de mama, câncer de bexiga, câncer da cabeça & pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer pulmonar, câncer ovariano, câncer do cólon, câncer da próstata, câncer renal, e câncer cerebral.

[0225] Ainda uma outra modalidade é o uso da ABM de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia do câncer. Câncer é como definido acima.

[0226] Preferivelmente, o dito câncer é selecionado do grupo con-

sistindo em câncer de mama, câncer de bexiga, câncer da cabeça & pescoço, câncer de pele, câncer pancreático, câncer pulmonar, câncer ovariano, câncer do cólon, câncer da próstata, câncer renal, e câncer cerebral.

[0227] Também preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,0 mg/kg a cerca de 15 mg/kg.

[0228] Também mais preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg.

[0229] Também mais preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg.

[0230] Também mais preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 12 mg/kg.

[0231] O mais preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 1,5 mg/kg.

[0232] Também o mais preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 4,5 mg/kg.

[0233] Também o mais preferivelmente, a dita molécula de ligação de antígeno é usada em uma quantidade terapeuticamente eficaz de cerca de 12 mg/kg.

[0234] Em uma outra modalidade, a presente invenção é direcionada a método de tratar um distúrbio relacionado a EGFR em um mamífero em necessidade de tratamento deste compreendendo administrar ao mamífero uma ABM da presente invenção, em que o tratamento resulta em concentrações séricas da dita ABM entre cerca de 1 e cerca de 500

µg/ml, durante um período de pelo menos 4 semanas, e em que o tratamento não causa um nível clinicamente significante de toxicidade no dito mamífero. Em outras modalidades, a concentração sérica é uma quantidade selecionada do grupo consistindo em acima de 1 µg/ml, acima de 25 µg/ml, acima de 50 µg/ml, acima de 100 µg/ml, acima de 200 µg/ml, acima de 300 µg/ml, acima de 400 µg/ml, acima de 500 µg/ml, entre cerca de 1 e cerca de 100 µg/ml, entre cerca de 1 e cerca de 200 µg/ml, entre cerca de 1 e cerca de 300 µg/ml, entre cerca de 1 e cerca de 400 µg/ml, e entre cerca de 1 e cerca de 500 µg/ml. Em uma modalidade preferida, o mamífero é um ser humano. Em uma modalidade a ABM é um anticorpo. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é glicoengendrado e tem ligação de FcgamaRIII aumentada comparada a uma forma não glicoengendrada do anticorpo.

Artigos de Fabricação

[0235] Em uma outra modalidade da invenção, um artigo de fabricação contendo materiais úteis para o tratamento dos distúrbios descrito acima é fornecido. O artigo de fabricação compreende um recipiente e uma inserção de rótulo ou pacote em ou associada com o recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente possui uma composição que é eficaz para tratar a condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco tendo uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo anti-EGFR. A inserção de rótulo ou pacote indica que a composição é usada para tratar a condição de escolha, tal como uma doença ou distúrbio não malignos, onde a doença ou distúrbio envolvem a ativação ou produção anormais de um receptor EGFR e/ou um ligando de EGFR, por exemplo uma doença ou distúrbio

bio hiperproliferativos benignos. Além disso, o artigo de fabricação pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição contida neste, em que a composição compreende um primeiro anticorpo que liga-se a EGFR e inibe o crescimento de células que superexpressam EGFR; e (b) um segundo recipiente com uma composição contida neste, em que a composição compreende um segundo anticorpo que liga-se a EGFR e bloqueia a ativação de ligando de um receptor EGFR. O artigo de fabricação nesta modalidade da invenção pode compreender ainda uma inserção de pacote indicando que a primeira e segunda composições de anticorpo podem ser usadas para tratar uma doença ou distúrbio não malignos da lista de tais doenças ou distúrbios na seção de definição acima. Além disso, a inserção de pacote pode instruir o usuário da composição (compreendendo um anticorpo que liga-se a EGFR e bloqueia a ativação de ligando de um receptor EGFR) a combinar a terapia com o anticorpo e qualquer uma das terapias adjuntas descritas na seção precedente (por exemplo um agente quimioterapêutico, um fármaco alvejado por EGFR, um agente antangiogênico, um agente imunossupressor, inibidor de tirosina cinase, um composto anti-hormonal, um cardioprotetor e/ou uma citocina). Alternativa, ou adicionalmente, o artigo de fabricação pode compreender ainda um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável, tal como água baterostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode incluir ainda outros materiais desejáveis a partir de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, e seringas.

[0236] Os exemplos abaixo explicam a invenção em mais detalhe. As preparações e exemplos seguintes são dados para permitir que aqueles versados na técnica entendam mais claramente e pratiquem a presente invenção. A presente invenção, entretanto, não é limitada em

escopo pelas modalidades exemplificadas, que são intencionadas como ilustrações de aspectos únicos da invenção apenas, e métodos que são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. De fato, várias modificações da invenção além daquelas descritas aqui tornar-se-ão evidentes àqueles versados na técnica a partir da descrição precedente e desenhos anexos. Tais modificações são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas.

[0237] Todas as patentes, pedidos de patente, e publicações citados neste pedido de patente são por meio deste incorporados por referência em sua totalidade.

Exemplos

[0238] A menos que de outro modo especificado, referências à numeração de posições de resíduo de aminoácido específicas nos Exemplos seguintes são de acordo com o sistema de numeração de Kabat. A menos que de outro modo observado, os materiais e métodos usados para fabricar os anticorpos descritos nestes exemplos de trabalho são de acordo com aqueles apresentados nos exemplos do Ped. de Patente U.S. Nº 10/981.738, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Método Aceitante de Homologia Elevada

[0239] A pesquisa de estrutura aceitante de anticorpo de homologia elevada foi realizada alinhando-se a sequência de proteína ICR62 de rato a uma coleção de sequências de linha germinativa humana e escolhendo aquela sequência humana que mostrou a identidade de sequência mais alta, enquanto conservando todos os resíduos canônicos em um nível funcional. Aqui, a sequência 1-e da família de VH1 dentro da base de dados VBase foi escolhida como a sequência aceitante de estrutura de cadeia pesada, e a sequência A30 da família de

VK1 da base de dados VBase foi escolhida para ser o aceitante de estrutura para a cadeia leve. Nestas duas estruturas aceitantes as três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e/ou resíduos determinantes de especificidade destas CDRs dos domínios variáveis pesados e leves de ICR62 de rato foram enxertados. Visto que a região de estrutura 4 não é parte da região variável do gene da linha germinativa, o alinhamento para esta posição foi realizado individualmente. A região JH6 foi escolhida para a cadeia pesada, e a região JK2 foi escolhida para a cadeia leve. A modelagem molecular do domínio de imunoglobulina designado revelou uma posição fora da CDR1 de Kabat requerendo potencialmente os resíduos de aminoácido de murino ao invés das unidades humanas fora da CDR. A reintrodução de resíduos de aminoácido de murino na estrutura humana geraria as assim chamadas "mutações reversas." Por exemplo, o resíduo de aminoácido aceitante humano na posição de Kabat 27 (Glicina em 1-e) foi mutado reverso a um resíduo de tirosina. Para mostrar a importância dos resíduos para a ligação de antígeno, variantes de anticorpo humanizadas foram designadas que incluíram ou omitiram mutações reversas. A cadeia leve de anticorpo humanizado não requereu nenhuma mutação reversa. Depois de designar as sequências de proteína, as sequências de DNA que codificam estas proteínas foram sintetizadas como detalhado abaixo.

Método de Estrutura Mista

[0240] Para evitar a necessidade para introduzir mutações reversas em posições críticas (críticas para reter boa afinidade de ligação de antígeno ou funções de anticorpo) da estrutura aceitante humana, foi investigado se a região de estrutura 1 (FR1), regiões de estrutura 1 (FR1) e 2 (FR2) juntas, ou região de estrutura 3 (FR3) de um anticorpo funcionalmente humanizado podem ser substituídas por sequências de anticorpo humano já tendo resíduos doadores, ou resíduos de amino-

ácido que são funcionalmente equivalentes aos resíduos doadores, em posições do resíduo importantes na sequência de linha germinativa humana natural. Para este propósito, as estruturas de VH 1, 2 e 3 da sequência de VH de ICR62 de rato foram alinhadas individualmente às sequências de linha germinativa humana. Aqui, a identidade de sequência mais alta não foi usada para escolher estruturas aceitantes; ao invés o emparelhamento de vários resíduos críticos foi realizado. Estes resíduos críticos compreendem os assim chamados resíduos canônicos, e também aqueles resíduos na posição 27, 28, e 30 (numeração de Kabat), que encontram-se fora da definição de CDR1 por Kabat, mas frequentemente são envolvidos na ligação de antígeno. Além disso, resíduos críticos são aqueles que mostram interação importante com as CDRs, como pode ser determinado usando a modelagem molecular. A sequência de IMGT IGHV1-58 (Nº de Acesso M29809), IGHV5-51 (Nº de Acesso M99686), assim como a sequência VBase 1-02 da família de VH1 foram escolhidas como unidades adequadas para substituir FR1, 2, ou 3. Em breve: IGHV1-58 mostrou um padrão promissor nas posições de Kabat 27 a 30, mas não cumpre os critérios para a posição canônica 71. O IGHV5-51 tem um resíduo correspondente 71, de modo que sua FR3 pode ser usada. Também sua FR1 está próxima à sequência de FR1 desejada.

[0241] A 1-e de VH1 cumpriu todos os critérios além da posição 27. A sequência 1-02 foi considerada aceitável para as regiões FR1 e FR2, mas requereria uma mutação reversa em FR3.

[0242] Depois de designar as sequências de proteína, as sequências de DNA que codificam estas proteínas foram sintetizadas como detalhado abaixo. Usando este método mutações reversas não foram necessárias na maioria dos constructos da cadeia pesada, de modo a reter bons níveis de ligação de antígeno. A cronologia e o raciocínio dos constructos de estrutura mista são explicados na seção de resultados.

Síntese dos genes de anticorpo

[0243] Depois de ter designada a região V da sequência de aminoácido do anticorpo humanizado, a sequência de DNA foi gerada. Os dados da sequência de DNA das regiões de estrutura individuais foram encontrados nas bases de dados (por exemplo IMGT ou VBase) para sequências de linha germinativa humana. A informação da sequência de DNA das regiões CDR foi tomada da sequência publicada do anticorpo ICR62 de rato (ver, por exemplo, Publicação PCT WO 95/20045). Com estas sequências, a sequência de DNA total foi virtualmente montada. Tendo estes dados de sequência de DNA, sítios de restrição de diagnóstico foram introduzidos na sequência virtual introduzindo-se mutações silenciosas, criando-se sítios de reconhecimento para endonucleases de restrição.

[0244] Para obter a cadeia de DNA físico, a síntese genética foi realizada (ver, por exemplo, Wheeler *et al.* 1995). Neste método, os oligonucleotídeos são designados dos genes de interesse, tal, que uma série de oligonucleotídeos são derivados do filamento de codificação, e uma outra série é do filamento de não codificação. As extremidades 3' e 5' de cada oligonucleotídeo (exceto o primeiro e último absolutos na lista) sempre mostram sequências complementares aos dois iniciadores derivados do filamento oposto. Quando colocando estes oligonucleotídeos em um tampão de reação adequado para qualquer polimerase estável ao calor, e adicionando Mg²⁺, dNTPs e uma DNA polimerase, cada oligonucleotídeo é estendido de sua extremidade 3'. A extremidade 3' recentemente formada de um iniciador depois recoze com o iniciador seguinte do filamento oposto, e estendendo sua sequência ainda sob condições adequadas para o alongamento de cadeia de DNA dependente padrão. O produto final foi clonado em um vetor convencional para a propagação em *E. coli*.

Produção de anticorpo

[0245] Para o constructo dos vetores de expressão de cadeia leve e cadeia pesada anti-EGFR quiméricos (isto é, completamente região V de rato e região C humana) e humanizados, sequências líderes de cadeia pesada e leve humana (para secreção) foram adicionadas a montante das sequências de DNA da região variável. A jusante das regiões variáveis, as regiões constantes de IgG1 para a cadeia pesada foram adicionadas, e a região constante capa para a cadeia leve usando técnicas de biologia molecular padrão. As sequências de DNA de cadeia pesada e leve de anticorpo completo resultantes foram subclonadas em vetores de expressão de mamífero (um para a cadeia leve e um para a cadeia pesada) sob o controle do promotor de MPSV e a montante de um sítio de poliA sintético, cada vetor portando uma sequência de EBV OriP.

[0246] Os anticorpos foram produzidos cotransfetando-se células HEK293-EBNA com os vetores de expressão de cadeia pesada e leve de anticorpo mamífero usando um método de transfecção de fosfato de cálcio. As células HEK293-EBNA exponencialmente crescentes foram transfectadas pelo método de fosfato de cálcio. Para a produção de anticorpo não modificado, as células foram transfectadas apenas com vetores de expressão de cadeia pesada e leve de anticorpo em uma razão de 1:1. Para a produção do anticorpo glicoengendrado, as células foram co-transfetadas com quatro plasmídeos, dois para a expressão do anticorpo, um para uma expressão de polipeptídeo de GnTIII de fusão, e um para a expressão de manosidase II em uma razão de 4:4:1:1, respectivamente. As células foram cultivadas como culturas de monocamada aderente em frascos T usando meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de FCS, e foram transfectadas quando elas foram entre 50 e 80 % confluentes. Para a transfecção de um frasco T75, 8 milhões de células foram semeadas 24 horas antes da transfecção em 14 ml de meio de cultura DMEM suplementado com

FCS (a 10 % V/V final), 250 µg/ml de neomicina, e as células foram colocadas a 37° C em uma incubadora com uma atmosfera de CO₂ a 5 % durante a noite. Para cada frasco T75 a ser transfectado, uma solução de DNA, CaCl₂ e água foi preparada misturando-se 47 µg de DNA de vetor de plasmídeo total divididos igualmente entre os vetores de expressão de cadeia leve e pesada, 235 µl de uma solução de CaCl₂ 1M, e adicionando água a um volume final de 469 µl. A esta solução, 469 µl de uma solução de 50 mM de HEPES, 280 mM de NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ no pH 7,05 foram adicionados, misturados imediatamente durante 10 s e deixados repousar na temperatura ambiente durante 20 s. A suspensão foi diluída com 12 ml de DMEM suplementado com 2 % de FCS, e adicionada ao T75 no lugar do meio existente. As células foram incubadas a 37° C, 5 % de CO₂ durante cerca de 17 a 20 horas, depois o meio foi substituído com 12 ml de DMEM, 10 % de FCS. O meio de cultura condicionado foi colhido 5 a 7 dias de pós transfecção centrifugado durante 5 min a 1200 rpm, seguido por uma segunda centrifugação durante 10 min a 4000 rpm e mantido a 4° C.

[0247] Os anticorpos secretados foram purificados por cromatografia por afinidade de Proteína A, seguido por cromatografia de troca de cátion e uma etapa cromatográfica de exclusão de tamanho final em uma coluna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) trocando o tampão para solução salina tampão de fosfato e coletando os anticorpos de IgG1 monoméricos puros. A concentração de anticorpo foi estimada usando um espectrofotômetro da absorbância a 280 nm. Os anticorpos foram formulados em uma solução de 25 mM de fosfato de potássio, 125 mM de cloreto de sódio, 100 mM de glicina de pH 6,7.

[0248] Variantes glicoengendradas do anticorpo humanizado foram produzidas por co-transfecção dos vetores de expressão de anticorpo juntamente com um vetor de expressão de GnT-III glicosiltransferase, ou juntamente com um vetor de expressão de GnT-III mais um vetor de

expressão de manosidase II de Golgi. Os anticorpos glicoengendrados foram purificados e formulados como descrito acima para os anticorpos não glicoengendrados. Os oligossacarídeos ligados à região Fc dos anticorpos foram analisados por MALDI/TOF-MS como descrito abaixo.

Análise de Oligossacarídeo

[0249] Os oligossacarídeos foram enzimaticamente liberados dos anticorpos por digestão com PNGaseF, com os anticorpos sendo imobilizados em uma membrana de PVDF ou em solução.

[0250] A solução de digestão resultante contendo os oligossacarídeos liberados preparada diretamente para a análise de MALDI/TOF-MS ou foi digerida ainda com EndoH glicosidase antes da preparação da amostra para a análise de MALDI/TOF-MS.

Método de liberação de oligossacarídeo para anticorpos imobilizados por membrana de PVDF

[0251] As cavidades de uma placa de 96 cavidades fabricada com uma membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) foram umedecidas com 100 µl de metanol e o líquido foi retirado através da membrana de PVDF usando vácuo aplicado ao coletor a vácuo Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). As membranas de PVDF foram lavadas três vezes com 300 µl de água. As cavidades depois foram lavadas com 50 µl de tampão de RCM (8 M de Uréia, 360 mM de Tris, 3,2 mM de EDTA, pH 8,6). Entre 30 a 40 µg de antícorpo foram carregados em uma cavidade contendo 10 µl de tampão de RCM. O líquido na cavidade foi retirado através da membrana aplicando-se vácuo, e a membrana foi subsequentemente lavada duas vezes com 50 µl de tampão de RCM. A redução das pontes de dissulfeto foi realizada por adição de 50 µl de ditiotreitol 0,1 M em RCM e incubação a 37° C durante 1 h.

[0252] A seguir da redução, um vácuo foi aplicado para remover a solução de ditiotreitol da cavidade. As cavidades foram lavadas três

vezes com 300 µl de água antes de realizar a carboximetilação dos resíduos de cisteína por adição de 50 µl de ácido iodoacético 0,1 M em tampão de RCM e incubação na temperatura ambiente no escuro durante 30 min.

[0253] Depois da carboximetilação, as cavidades foram retiradas com vácuo e subsequentemente lavadas três vezes com 300 µl de água. A membrana de PVDF depois foi bloqueada, para impedir a adsorção da endoglicosidase, incubando-se 100 µl de uma solução aquosa a 1 % de polivinilpirrolidona 360 na temperatura ambiente durante 1 hora. O reagente de bloqueio depois foi removido por vácuo suave seguido por três lavagens com 300 µl de água.

[0254] Os oligossacarídeos N-ligados foram liberados por adição de 2,5 mU de peptídeo-N-glicosidase F (N-Glycanase recombinante, GLYKO, Novato, CA) e 0,1 mU de Sialidase (GLYKO, Novato, CA), para remover quaisquer resíduos de monossacarídeo carregados potenciais, em um volume final de 25 µl em 20 mM de NaHCO₃, pH7,0). A digestão foi realizada durante 3 horas a 37° C.

Método de liberação de oligossacarídeo para anticorpos em solução

[0255] Entre 40 e 50 µg de anticorpo foram misturados com 2,5 mU de PNGaseF (Glyko, U.S.A.) em 2 mM de Tris, pH 7,0 em um volume final de 25 microlitros, e a mistura foi incubada durante 3 horas a 37° C.

[0256] Uso de digestão com Endoglicosidase H de oligossacarídeos de PNGaseF liberados para a designação de estruturas de oligossacarídeo bifurcadas híbridas aos picos de oligossacarídeos neutros de MALDI/TOF-MS

[0257] Os oligossacarídeos de PNGaseF liberados foram subsequentemente digeridos com Endoglicosidase H (EC 3.2.1.96). Para a digestão com EndoH, 15 mU de EndoH (Roche, Suíça) foram adicionados à digestão com PNGaseF (método do anticorpo em solução

acima) para fornecer um volume final de 30 microlitros, e a mistura foi incubada durante 3 horas a 37° C. EndoH cliva entre os resíduos de N-acetilglicosamina do núcleo de quitobiose de oligossacarídeos N-ligados. A enzima pode digerir apenas oligomanose e glicanos do tipo mais híbridos, ao passo que oligossacarídeos do tipo complexo não são hidrolisados.

Preparação da amostra para MALDI/TOF-MS

[0258] As digestões enzimáticas contendo os oligossacarídeos liberados foram incubadas durante um adicional de 3 h no ambiente depois da adição de ácido acético a uma concentração final de 150 mM, e foram subsequentemente passadas através de 0,6 ml de resina de troca de cátion (resina AG50W-X8, forma de hidrogênio, 100 a 200 malhas, BioRad, Suíça) empacotada em uma coluna de cromatografia micro-bio-spin (BioRad, Suíça) para remover cátions e proteínas. Um microlitro da amostra resultante foi aplicado a uma placa alvo de aço inoxidável, e misturado na placa com 1 µl de matriz sDHB. A matriz sDHB foi preparada dissolvendo-se 2 mg de ácido 2,5-diidroxibenzóico mais 0,1 mg de ácido 5-metoxissalicílico em 1 ml de etanol/10 mM de cloreto de sódio aquoso 1:1 (v/v). As amostras foram secas ao ar, 0,2 µl de etanol foi aplicado, e as amostras foram finalmente deixadas recristalizar sob ar.

MALDI/TOF-MS

[0259] O espectrômetro de massa MALDI-TOF usado para adquirir os espectros de massa foi um Voyager Elite (Perspective Biosystems). O instrumento foi operado na configuração linear, com uma aceleração de 20kV e retardo de 80 ns. A calibração externa usando padrões de oligossacarídeo foi usada para a designação da massa dos íons. Os espectros de 200 descargas a laser foram somados para obter o espectro final.

Ensaio de Ligação de Antígeno

[0260] As variantes de anticorpo humanizadas monoméricas, purificadas foram testadas quanto à ligação ao receptor do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR, também referido na literatura como HER-1 ou ErbB1) na linhagem de célula epidérmica humana A431, usando um ensaio com base em citometria de fluxo. 200.000 células (por exemplo, da linhagem de célula A431 humana) em 180 µl de tampão FACS (PBS contendo 2 % de FCS e 5 mM de EDTA) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 ml e 20 µl de amostras de anticorpo anti-EGFR (anticorpo primário) concentradas 10 vezes (1 a 5000 ng/ml de concentração final) ou PBS apenas foram adicionados. Depois de misturar suavemente as amostras, os tubos foram incubados a 4° C durante 30 min no escuro. Subsequentemente, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão FACS e peletizadas a 300 x g durante 3 min. O sobrenadante foi separado por aspiração e as células foram absorvidas em 50 µl de tampão FACS e 2 µl de anticorpo secundário (fragmentos F(ab')2-FITC anti-Fc-específico (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)) foram adicionados e os tubos foram incubados a 4° C durante 30 min. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão FACS e absorvidas em 500 µl de tampão FACS para a análise por Citometria de Fluxo. A ligação foi determinada plotando-se a fluorescência média geométrica contra as concentrações de anticorpo.

Ligação de glicovariantes de IgG1 monoméricas à linhagem de célula CHO que expressa Fc_γRIIIA

[0251] As células CHO foram transfectadas por eletroporação (280 V, 950 µF, 0,4 cm) com um vetor de expressão que codifica a cadeia α e a cadeia γ de FcgamaRIIIA-Val158. Os transfectantes foram selecionados por adição de 6 µg/ml de puromicina e clones estáveis foram analisados por FACS usando 10 µl de anticorpo monoclonal 3G8 anti-FcgamaRIII conjugado a FITC (BD Biosciences, Allschwil/Suíça) para 106 células. A ligação de IgG1 a células CHO que expressam Fcga-

maRIIIA-Val158 foi realizada. Brevemente, os fragmentos F(ab')2 de 3G8 anti-FcgamaRIIIA (Ancell, Bayport, MN/USA) foram adicionados em uma concentração de 10 µg/ml para competir pela ligação de glicocovariantes de anticorpo (3 µg/ml). A intensidade de fluorescência referindo-se às variantes de anticorpo ligadas foi determinada em um FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Suíça).

Ensaio de ADCC

[0261] Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas foram usadas como células efetoras e foram preparadas usando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, M063178 USA) seguindo essencialmente as instruções do fabricante. Em breve, o sangue venoso foi tirado com seringas heparinizadas de voluntários saudáveis. O sangue foi diluído 1:0,75 a 1,3 com PBS (não contendo Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺) e dividido em camadas em Histopaque-1077. O gradiente foi centrifugado a 400 x g durante 30 min na temperatura ambiente (TA) sem interrupções. A interfase contendo as PBMC foi coletada e lavada com PBS (50 ml por células a partir de dois gradientes) e colhida por centrifugação a 300 x g durante 10 minutos na TA. Depois da ressuspensão da pelota com PBS, as PBMC foram contadas e lavadas uma segunda vez por centrifugação a 200 x g durante 10 minutos na TA. As células depois foram ressuspensas no meio apropriado para os procedimentos subsequentes.

[0262] A razão de efetor para alvo usada para os ensaios de ADCC foi 25:1 e 10:1 para PBMC e células NK, respectivamente. As células efetoras foram preparadas em meio AIM-V na concentração apropriada de modo a adicionar 50 por cavidade de placas de 96 cavidades de fundo redondo. As células alvo foram células que expressam EGFR humano (por exemplo, A431, EBC-1, ou LN229) cultivadas em DMEM contendo 10 % de FCS. As células alvo foram lavadas em PBS, contadas e ressuspensas em AIM-V a 0,3 milhões por ml de mo-

do a adicionar 30.000 células em 100 µl por microcavidade. Os anticorpos foram diluídos em AIM-V, adicionados em 50 µl às células alvo pré-plaqueadas e deixados ligar-se aos alvos durante 10 minutos na TA. Depois as células efetoras foram adicionadas e a placa foi incubada durante 4 horas a 37° C em uma atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. A morte de células alvo foi avaliada por medição de liberação de lactato desidrogenase (LDH) de células danificadas usando o kit de Detecção de Citotoxicidade (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suíça). Depois da incubação de 4 horas as placas foram centrifugadas a 800 x g. 100 µl de sobrenadante de cada cavidade foram transferidos a uma nova placa de 96 cavidades de fundo plano transparente. 100 µl de tampão de substrato colorido do kit foram adicionados por cavidade. Os valores de Vmax da reação com cor foram determinados em um leitor de ELISA a 490 nm durante pelo menos 10 min usando o software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). A liberação de LDH espontânea foi medida de cavidades contendo apenas células alvo e efetoras mas nenhum anticorpo. A liberação máxima foi determinada de cavidades contendo apenas células alvo e 1 % de Triton X-100. A porcentagem de morte mediada por anticorpo específico foi calculada como segue: $((x - SR)/(MR - SR)*100$, onde x é a média de Vmax em uma concentração de anticorpo específica, SR é a média de Vmax da liberação espontânea e MR é a média de Vmax da liberação máxima.

Exemplo 2

Resultados e Debate

[0263] A comparação da ligação ao receptor de EGF humano de variantes de anticorpo I-HHA, I-HHB, I-HHC, I-HLA, I-HLB, I-HLC, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, I-HLA6, I-HLA7, I-HLA8, I-HLA-9, I-HHD, I-HHE, I-HHF, e I-HHG, complexadas com a cadeia leve de ICR62 quimérico ou com as cadeias leves de ICR62 humaniza-

do (I-KA, I-KB, ou I-KC) e o anticorpo quimérico, parental ch-ICR62 mostra que todos os anticorpos têm valores de EC50 similares dentro de uma unidade de log. Apenas a I-HHA diminuiu fortemente a atividade de ligação (ver a figura 2). A figura 1 mostra a atividade funcional das cadeias de polipeptídeo de ICR62 quimérico individual (ch-ICR62) quando combinada com os constructos humanizados I-HHC e I-KB, respectivamente. Neste experimento, a cadeia leve, a cadeia pesada ou ambas as cadeias simultaneamente do ch-ICR62 foram substituídas pelos constructos humanizados acima mencionados. Isto mostra que a formação da interface VH/VL parece funcionar como o cavidade no anticorpo de roedor assim como nos constructos humanizados.

[0264] Como mostrado na figura 2, a I-HHA de cadeia pesada humanizada pode não restaurar a atividade de ligação com a cadeia leve de I-KA, ou de I-KB. Visto que a I-HLA não mostrou nenhuma ligação tanto com a I-KA, quanto com a I-KB, os presentes inventores concluíram que a cadeia pesada de I-HHA não é funcional na ligação de antígeno. As figuras 1 e 2, combinadas com a figura 3, mostram que os constructos de cadeia leve I-KA, I-KB, e I-KC mostram comportamento de ligação indistinguível da contraparte de roedor. A variante I-KC não possui nenhuma mutação reversa, e adicionalmente tem sua CDR1 parcialmente humanizada, tal que os resíduos 24 a 29 podem ser derivados da sequência aceitante humana (A30 de VK1, como mencionado antes).

[0265] Na série I-HHA, I-HHB, e I-HHC, apenas as últimas duas variantes mostraram comportamento de ligação satisfatório (figuras 2 e 3). A análise de sequência do I-HHA revelou três resíduos de aminoácido potenciais responsáveis por este comportamento: Lys33, His35, e Tyr50. Os constructos que têm Lys33 substituído por tirosina mostraram boa ligação, assim como constructos tendo o Tyr50 substituído por triptofano. Apenas quando estes dois resíduos foram substituídos por alanina e glicina, respectivamente, foi a ligação perdida. Visto que

I-HHC não mostrou ligação melhor do que I-HHB, os presentes inventores concluíram que os resíduos Asn60, Glu61, Lys64, e Ser65 não precisam ser de origem de roedor; ou eles podem ser substituídos por Ala, Gln, Gln, e Gly, respectivamente. Este procedimento leva a um constructo em que a CDR2 é mais humanizada, visto que as posições de aminoácido 60 a 65 são parte da definição de CDR de Kabat, mas não existe nenhuma necessidade para enxertar os resíduos doadores de roedor para este anticorpo.

[0266] As figuras 4 e 5 comparam-se aos constructos da série I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, e I-HLA6. O melhor comportamento de ligação foi observado nos constructos ch-ICR62, I-HLA1, e I-HLA2, com um valor de EC50 de aprox. 300 ng/ml. Os outros constructos tiveram este valor aumentado por um fator de dois, e portanto têm atividade de ligação levemente reduzida. A primeira conclusão a partir destes dados é que, dentro da CDR1 de Kabat, as substituições de Lys33Tyr, e as de Ile34Met foram toleradas. Estas duas posições estão localizadas dentro da definição de Kabat de CDR1, mas fora dos limites de CDR de Chothia (que foram fundamentados na análise estrutural ao invés da análise de sequência). Na última parte de CDR1, depois, pelo menos alguma heterogeneidade é permitida.

[0267] A segunda conclusão é que, dentro da CDR2, além da substituição acima mencionada de resíduos Asn60 e Glu61 por resíduos não doadores, substituições não doadoras Asn60Ser, Glu61Pro, e Lys62Ser dentro da CDR de Kabat também foram permitidas. Estes resíduos foram derivados da sequência aceitante de IGHV5-51 da linha germinativa humana, que foi usada como uma sequência aceitante de FR3. Os constructos I-HLA3 e I-HLA4 diferem de I-HLA1 e I-HLA2 apenas pela remoção da mutação reversa de Phe27Tyr, e tanto os constructos I-HLA3 quanto I-HLA4 perdem afinidade comparada a seu constructo parental. Portanto, a terceira conclusão da comparação

de I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, e I-HLA6 é o envolvimento de Phe27 na ligação de antígeno, direta ou indiretamente, por intermédio de modificar a conformação do anel de CDR1.

[0268] Variantes I-HLA5 e I-HLA6 têm a FR1 de I-HLA1 e I-HLA2, respectivamente, substituída por uma outra sequência aceitante da linha germinativa com o Phe27 naturalmente presente (isto é, IGHV1-58). Isto apenas pode ser obtido introduzindo-se simultaneamente várias outras mutações que são: Val2Met, Ala9Pro, e Alal6Thr. Sendo assim, o efeito benéfico de (re-)introduzir o Phe27 foi novamente anulado.

[0269] O constructo I-HLA7 foi avaliado para determinar se a restauração de resíduos doadores adicionais na CDR1 e CDR2 de cadeia pesada do constructo I-HLA6 restauraria a atividade de ligação total quando comparada a ICR62. Como mostrado na figura 6, este não foi o caso.

[0270] Como mostrado nas figuras 7 e 8, dois constructos adicionais, I-HLA8 e I-HLA9, foram testados para determinar se a atividade de ligação total comparada à ch-ICR62 pode ser obtida. Partindo do constructo I-HHB, as regiões FR1 foram substituídas por regiões FR1 tendo homologia máxima dentro da região CDR1 de Chothia. O constructo I-HLA8 tem a FR1 da sequência de IGHV1-58, e a I-HLA9 tem a região FR1 de IGHV5-51. Ambos aos constructos ligaram-se ao antígeno pelo menos assim como o anticorpo ch-ICR62. O constructo I-HLA8, de fato, pode ser ainda melhor, com a EC50 diminuída por um fator de 2. O constructo I-HLA8 tem a mesma sequência de FR1 como os constructos I-HLA5 e I-HLA6 e portanto tem os mesmos resíduos não doadores (isto é, Val2Met, Ala9Pro, e Alal6Thr), sugerindo que a presença destes resíduos não doadores não tem um efeito negativo na ligação. Mutações não benéficas que ocorrem na I-HLA5 e 6 resultam da combinação de uma

FR1 de VH1 emparelhada com uma FR3 de VH5, que pode potencialmente ser compensada por ter uma FR1 e uma FR3 da mesma família de VH.

[0271] Mostradas na figura 8 são os constructos que contêm resíduos não doadores dentro das CDRs. Assim, estes constructos são ainda mais humanizados dentro das CDRs porque os resíduos não doadores ocorrem nas regiões de estrutura humana que foram escondidas para estes constructos. Os constructos I-HHE (His35Ser), I-HHF (Thr58Asn) e I-HHG (Ser57Ala) todos têm um resíduo dentro da CDR1 ou CDR2 que é humanizado (comparada ao constructo I-HHB). O constructo I-HHD (Gly24Ala) também foi avaliado. I-HHF mostrou ligação reduzida indicando a importância de Thr58. Ao contrário do resíduo 58 de CDR de Kabat, o aminoácido 57 é mais tolerante às substituições, visto que a mutação de Ser57Ala aparentemente não tem nenhuma influência na ligação (figura 8).

[0272] Visto que a região FR3 de IGHV5-51 pareceu mostrar propriedades promissoras nos constructos I-HLA1 e 2, e a FR1 da mesma sequência de linha germinativa provou ser útil no constructo I-HLA9, a FR1, FR2, e FR3 de IGHV5-51 foi designada ser usada juntamente como um aceitante para anel do enxerto.

Sumário da análise dos resíduos canônicos em constructos de ICR62 humanizados:

- VL: posição de Kabat 2: Ile provavelmente necessário.
- posição de Kabat 71: Ile ou Phe permitidos.
- VH: Pos. 24, Gly, Thr, Ala, Val, Ser permitidos.
- Pos. 26, Gly permitido.
- Pos. 29, Phe, Ile, Leu, Val, Ser permitidos.
- Pos. 34, Ile, Met, Leu, Val, Trp, Tyr, Thr permitidos.
- Pos. 71, Ala, Leu, Val, Thr permitidos.
- Pos 94, Arg, Gly, Asn, Lys, Ser, His, Thr, Ala permitidos.

Resultados dos experimentos de ADCC

[0273] A figura 9 mostra uma comparação da citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) é mostrada para as várias glicoformas do anticorpo ICR62 quimérico, assim como para a variante humanizada I-HLA4. As glicoformas diferentes são marcadas por um rótulo que indica não glicoengendrado (WT), Glicoforma 1 (G1), ou Glicoforma 2 (G2). "G1" refere-se à glicoengenharia do anticorpo por co-expressão com GnTIII. "G2" refere-se à glicoengenharia do anticorpo por co-expressão com GnTIII e ManII. "WT" refere-se aos anticorpos que não foram glicoengendrados. A cadeia leve para todas os constructos humanizados é a variante I-KC, e não foi rotulado explicitamente.

[0274] O quimérico, assim como o anticorpo humanizado foram melhorados em sua potência e eficácia pelos dois métodos de glicoengenharia diferentes. O constructo de ch-ICR62 realizou-se levemente melhor do que I-HLA4 para o tipo selvagem ou as glicoformas, respectivas. Como observado na figura 4, quando comparando as afinidades dos dois anticorpos com respeito ao seu antígeno, o ch-ICR62 teve um valor de EC50 duas vezes mais baixo. Esta diferença em afinidade é aqui refletida em diferenças em eficácia.

[0275] A figura 10 mostra uma comparação da citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) para o não glicoengendrado ("tipo selvagem") e a glicoforma G2 dos constructos de anticorpo ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7. Os mesmos anticorpos foram aplicados a duas linhagens de célula alvo diferentes. No painel A da figura 10, a linhagem de célula alvo LN229 é usada; e no painel B da figura 10, a linhagem de célula A431 foi usada. As células A431 são aparentemente mais suscetíveis com respeito à morte celular mediada por anticorpo do que as células LN229. Mais importante, a glicoengenharia realçou a potência de ambos os anticor-

pos. Este efeito pareceu ser mais pronunciado para a I-HLA7 do que para a I-HHB. A porcentagem de morte celular na concentração de anticorpo máxima para a I-HHB pode ser mudada de ~ 30 % para ~ 40 % introduzindo-se a variante glicoengendrada G2, quando do uso da linhagem de célula alvo LN229. Quando do uso da linhagem de célula A431, este valor foi aparentemente inalterado. Este comportamento foi completamente diferente para o anticorpo de I-HLA7. A morte de célula alvo na concentração de anticorpo máxima foi mudada de cerca de 10 % para cerca de 50 %, para as células LN229, e de cerca de 40 % para cerca de 70 % para as células A431 introduzindo-se as variantes de glicoengenharia de G2. Neste caso, apesar de ter atividade mais baixa no anticorpo não glicoengendrado para a I-HLA7 em relação a I-HHB, a classificação da atividade é anulada para os anticorpos glicoengendrados. As figuras 11 e 12 também mostram comparações de formas não glicoengendradas (WT) e glicoformas G2 de constructos de anticorpo ICR62 quimérico e ICR62 humanizado I-HHB e I-HLA7.

Exemplo 3

Estudo de Toxicidade Preliminar por Administração Intravenosa (Bolus) a Macacos-carangueeiros -- Análise Bioanalítica

Introdução

Ensaio de Anti-EGFR Glico-Engendrada

[0276] Esta Análise Bioanalítica descreve a medição de anti-EGFR em amostras que originam-se de macacos-carangueeiros a seguir da administração intravenosa (bolus) de anti-EGFR (anticorpo anti-EGFR glicoengendrado, recombinante produzido a partir de células mamíferas transfetadas em cultura com vetores de expressão de anticorpo que abrigam os genes I-HHB de cadeia pesada e os I-KC de cadeia leve como descrito acima, e purificados como descrito acima) como descrito no protocolo apresentado aqui abaixo. Um to-

tal de 78 amostras de soro de macaco foram armazenadas congeladas em cerca de -20° C até o uso.

[0277] Os métodos bioanalíticos usados para a determinação de anti-EGFR usaram um método de ELISA para medir as concentrações séricas de anti-EGFR. Critérios de aceitação foram determinados em \pm 20 % (\pm 25 % de QC baixa) para a precisão e inexatidão.

Materiais e Métodos

[0278] Objetivo: O objetivo deste estudo foi a avaliação de potencial tóxico sistêmico de administração intravenosa (bolus) de Glyco-mAb (anti-EGFR) aos Macacos-carangueeiros seguido por um período de recuperação de 8 semanas.

Tabela 8

Modelo animal	Macacos-carangueeiros, aceito por agências reguladoras, dados de fundo disponíveis.
Justificação para o uso do primata	O primata foi a espécie que não de roedor de escolha porque ele sozinho conserva dois parâmetros críticos: reconhecimento do antígeno de EGFR pelo reconhecimento do anticorpo de teste, e região Fc de anticorpo de teste pelos receptores de Fc do sistema imune.
Via	Intravenosa (Bolus), para simular as condições da administração química.

Tabela 9: Tratamento dos grupos e dosagens

Grupo	1	2	3
Composto	Glyco-mAb(Anti-EGFR)		
Dosagem (mg/kg/dia)	1,5	4,5	12

Lógica para a seleção do nível de dosagem

[0279] 1,5 a 7,5 mg/kg é a faixa esperada para estudos em seres humanos (7,5 mg/kg sendo a dose correspondente para um composto similar em seres humanos).

Tabela 10: Identidade dos grupos de tratamento

Grupo	Tratamento	Dosagem (mg/kg/dia) Nº	Número de ani- mais		Números de ID de Animal	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
1	Glyco-mAb (Anti-EGFR)	1,5	1	1	623	590
2	Glyco-mAb (Anti-EGFR)	4,5	1	1	461	462
3	Glyco-mAb (Anti-EGFR)	12	1	1	463	612

Nº Expressado em termos da substância de teste como fornecido.

Tabela 11: Animais

Espécie	Macaco-caranguejeiro (propósito criado).
Idade aceita	Aproximadamente 15 meses.
Faixa de peso ordenada	1,5 a 2,5 kg.

Tabela 12: Administração de Anti-EGFR

Via	Injeção intravenosa.
Tratada em	Dosagens constantes em mg/kg/ocasião.
Dosagem em volume	Calculada antecipadamente, com base no peso corporal o mais recentemente registrado.
Volume de dose individual	1 ml/kg/dia
Frequência	Dias 1, 8, 15 e 22, imediatamente antes da alimentação.
Sequência	Por grupo.
Sítios de dose	Usando veias safenas esquerdas.
Injeção	Bolus, agulha descartável estéril nova por animal.

Formulação	Um registro do uso da formulação foi mantido com base nos pesos. Este equilíbrio é comparado com o uso esperado como uma verificação da administração correta.
------------	--

Tabela 13: Observações clínicas

Animais e suas bandejas de gaiola	Visualmente inspecionados pelo menos duas vezes diariamente quanto à evidência de reação para o tratamento ou má saúde.
Desvios do normal registrados no tempo em relação a	Natureza e severidade. Data e tempo do início. Duração e progresso da condição observada.
Exame físico	Uma vez toda semana para todos os animais.
Registros diários das bandejas de gaiola	Quanto a vômito, sangue, diarréia, etc.

Tabela 14: Frequência de dosagem:

Frequência	1. Imediatamente pré-dose. 2. $\frac{1}{2}$ a 2 horas depois da conclusão da dosagem. 3. Ainda possível no dia de trabalho.
Sítios de injeção	Diariamente.

Tabela 15: Toxicocinética

Horas de tempos de amostra depois da dosagem.	Animais	Dia
1, 4, 12, 24, 72, 120.	Todos os animais	1
Pré-dose, 1 hora pós-dose (169 horas depois da dose do Dia 1).	Todos os animais	8

Dia	Animais	Horas de tempos de amostra depois da dosagem.
15	Todos os animais	Pré-dose, 1 hora pós-dose (337 horas depois da dose do Dia 1).
22	Todos os animais	Pré-dose, 1 hora pós-dose (505 horas depois da dose do Dia 1).
29	Todos os animais	672 horas depois da dose do Dia 1.

Tabela 16: Amostras

Sítio de amostra	Veia adequada.
Anticoagulante/Volume da Amostra	Nenhum anticoagulante/0,7 ml.
Número total das amostras tomadas	104.
Separação do soro	Por centrifugação na temperatura ambiente a menos que de outro modo indicado para fornecer um mínimo de 0,3 ml, onde possível.
Armazenamento do soro	Tubos plásticos apropriadamente rotulados. Congelado (aproximadamente -20° C), enquanto esperando a bioanálise.

HistologiaTabela 17: Fixação do Tecido

Padrão	10 % de Formalina Tamponada Neutra.
Outros	Testes e epididimidas: Inicialmente em fluido de Bouin. Olhos: Inicialmente em fluido de Davidson.

Tabela 18: Histologia

Processamento	Todos os animais.
Coloração de rotina	4 a 5 µm de seções tingidas com hematoxilina e eosina.

Procedimento de Imunoensaio

[0280] Uma placa foi revestida com 100 µl por cavidade de solução de revestimento (5 µl de IgG anti-humana de ovelha (IgG absorvida por macaco, o Sítio de Ligação, UK) adicionados a 11495 µl de tampão de bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e incubados durante aproximadamente 2 horas na temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes com 400 µl por cavidade de solução de lavagem (PBS (Sigma Chemical Co., UK) 0,01 % (v/v) de Triton-X100 (Sigma Chemical Co., UK)) e seco por esvaziamento por punção.

[0281] O tampão de ensaio (1 % p/v de BSA, Sigma Chemical Co., UK) foi adicionado a 200 µl por cavidade e incubado durante aproximadamente 1 hora na temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes com 400 µl por cavidade de solução de lavagem e seca por esvaziamento por punção.

[0282] Os padrões de calibração, Controles de Qualidade (QC) e/ou amostras foram adicionados a 100 µl por cavidade e incubados durante aproximadamente 2 horas na temperatura ambiente, depois do que a placa foi lavada 3 vezes com 400 µl por cavidade de solução de lavagem e seca por esvaziamento por punção.

[0283] A solução conjugada (6 µl de conjugado de capa-HRP anti-IgG humana de cabra (Bethyl Laboratories Inc., USA) adicionado a 12 ml tampão de ensaio) foi adicionada a 100 µl por cavidade e incubada durante aproximadamente 1 hora na temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes com 400 µl por cavidade de solução de lavagem e seca por esvaziamento por punção.

[0284] Trimetilbenzidina (TMB; Europa Bioproducts, Ely, UK) foi adicionada a 100 µl por cavidade. A placa foi coberta e incubada durante aproximadamente 15 minutos na temperatura ambiente. 100 µl de solução de parada (0,5 M de HCl, Fisher, UK) depois foram adicionados a cada cavidade. As absorbâncias foram lidas a 450 nm (filtro de referência 630 nm) em um leitor de microplaca DYNATECH

MRX (Mettler Instruments, UK).

Resultados e Debate

Análise da Amostra de Teste

[0285] As concentrações de anti-EGFR foram medidas por um método de imunoensaio (ELISA) em 78 amostras de soro de macaco geradas de acordo com o protocolo descrito aqui acima. Estes resultados são apresentados nas Tabelas 19 a 21, abaixo.

Tabela 19

Concentração sérica de anti-EGFR em soro de macaco ($\mu\text{g/ml}$) a seguir da administração intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR nos dias 1, 8, 15 e 22

(Grupo 1)

Ponto no tempo	Número do animal 1M6231F590		média	sd
Dia 1 1 hora	33,42	30,86	32,14	1,8
Dia 1 4 horas	27,33	27,49	27,41	0,1
Dia 1 12 horas	13,09	17,01	15,05	2,8
Dia 1 24 horas	9,656	9,468	9,562	0,1
Dia 1 72 horas	2,528	0,786	1,657	1,2
Dia 1 120 horas	0,845	0,431	0,638	0,3
Dia 8 pré-dose	0,538	0,287	0,413	0,2
Dia 8 1 hora	30,02	19,07	24,55	7,7
Dia 15 pré-dose	0,902	0,382	0,642	0,4
Dia 15 1 hora	17,91	33,08	25,50	10,7
Dia 22 pré-dose	1,065	0,595	0,830	0,3
Dia 22 1 hora	19,41	33,00	26,21	9,6
Dia 1 672 horas	1,202	0,362	0,782	0,6

sddesvio padrão

Tabela 20

Concentração sérica de anti-EGFR em soro de macaco ($\mu\text{g/ml}$) a se-

uir da administração intravenosa de 5,0 mg/kg de anti-EGFR nos dias 1, 8, 15 e 22
 (Grupo 2)

Ponto no tempo	Número do animal 2M 4612F 462		Média	sd
Dia 1 1 hora	32,45	29,51	30,98	2,1
Dia 1 4 horas	32,39	29,57	30,98	2,0
Dia 1 12 horas	28,05	25,88	26,97	1,5
Dia 1 24 horas	23,70	23,78	23,74	0,1
Dia 1 72 horas	14,03	14,38	14,21	0,2
Dia 1 120 horas	10,42	8,137	9,279	1,6
Dia 8 pré-dose	4,672	3,683	4,178	0,7
Dia 8 1 hora	25,91	31,06	28,49	3,6
Dia 15 pré-dose	5,752	5,450	5,601	0,2
Dia 15 1 hora	32,20	35,38	33,79	2,2
Dia 22 pré-dose	BLQ	6,497	3,249	-
Dia 22 1 hora	26,98	30,23	28,61	2,3
Dia 1 672 horas	BLQ	4,845	2,423	-

BLQabaixo do limite de quantificação (< 0,195 µg/ml)

Sddesvio padrão

Note:BLQ entraram como zero nos cálculos

Tabela 21

Concentração sérica de anti-EGFR em soro de macaco (µg/ml) a seguir da administração intravenosa de 15 mg/kg de anti-EGFR nos dias 1, 8, 15 e 22

(Grupo 3)

Ponto no tempo	Número do animal 3M 4633F 612		Média	sd
Dia 1 1 hora	262,2	168,0	215,1	66,6
Dia 1 4 horas	223,3	174,5	198,9	34,5

Ponto no tempo	Número do animal 3M 4633F 612		Média	sd
Dia 1 12 horas	164,9	165,7	165,3	0,6
Dia 1 24 horas	141,7	146,0	143,9	3,0
Dia 1 72 horas	99,54	86,64	93,09	9,1
Dia 1 120 horas	86,64	69,08	77,86	12,4
Dia 8 pré-dose	65,86	45,21	55,54	14,6
Dia 8 1 hora	282,1	209,9	246,0	51,1
Dia 15 pré-dose	98,43	71,21	84,82	19,2
Dia 15 1 hora	385,9	231,4	308,7	109,2
Dia 22 pré-dose	117,3	105,6	111,5	8,3
Dia 22 1 hora	234,1	402,5	318,3	119,1
Dia 1 672 horas	127,5	122,9	125,2	3,3

sddesvio padrão

Exemplo 4

Estudo de toxicidade preliminar por administração intravenosa (bolus) aos macacos-carangueeiros -- Toxicocinética

Sumário

[0286] Três grupos de macacos-carangueeiros (1 macho e 1 fêmea por grupo) foram administrados com doses de bolus intravenosas de anti-EGFR nos Dias 1, 8, 15 e 22 de um estudo de toxicidade de 28 dias de modo a avaliar a exposição sistêmica dos animais a anti-EGFR. Concentrações séricas de anti-EGFR em amostras coletadas até 672 horas depois da primeira dose foram determinadas por meio de um método de imunoensaio. A análise farmacocinética da concentração sérica-dados de tempo resultou nos parâmetros farmacocinéticos seguintes:

Tabela 22

Dose (mg/kg)	Animal	C _{max} (μg/mL)	T _{max} (h)	AUC _t (μg.h/mL)	AUC (μg.h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (mL/kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5

Dose (mg/kg)	Animal	C_{max} (μ g/mL)	T_{max} (h)	AUC_t (μ g.h/mL)	AUC (μ g.h/mL)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (mL/kg)	k (1/h)	$t_{1/2}$ (h)
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a
a		O valor é uma estimativa visto que os dados não satisfizeram todos os critérios de aceitação definidos no Processamento de Dados e deve ser tratada com cautela							

[0287] Os relacionamentos entre as áreas nas curvas de concentração-tempo de anti-EGFR sérico (AUC_{168}) e nível de dose no Dia 1 são apresentados abaixo:

Tabela 23

Nível de dose (mg/kg/ocasião)	Nível de dose razão	Razão de AUC_{168}	
		Machos	Fêmeas
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

[0288] A taxa e extensão da exposição sistêmica de macacos a anti-EGFR, caracterizadas por AUC_{168} , aumentou aproximada e proporcionalmente com dose crescente sobre a faixa de dose de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasião mas em mais do que o aumento de dose proporcional sobre a faixa de dose de 4,5 a 12 mg/kg/ocasião no Dia 1. Na dose mais alta (12 mg/kg/ocasião) o AUC_{168} foi cerca de 2,8 vezes mais alto do que aquele prognosticado por um relacionamento linear.

[0289] A extensão (AUC_{168}) da exposição sistêmica de macacos fêmeas a anti-EGFR foi geralmente similar à exposição em macacos machos.

[0290] Depois de doses intravenosas repetidas, as concentrações séricas de pré-dose de anti-EGFR foram geralmente mais altas do que aqueles valores depois de uma dose única e indicou o acúmulo de anti-EGFR no soro por todo o período do estudo.

[0291] A meia-vida terminal pode não ser estimada adequadamente para todos os animais, mas onde ela pode ser estimada foi na faixa de 32,5 a 63,1 horas, e pareceu aumentar com a dose em animais machos. A liberação de soro total de anti-EGFR pareceu ser independente da dose sobre a faixa de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasião mas foi reduzida no nível de dose de topo em macacos machos e fêmeas.

[0292] Em conclusão, a extensão da exposição sistêmica de macacos-carangueiros a anti-EGFR pareceu ser caracterizada por cinética não linear (dependente de dose) sobre a faixa de dose de 1,5 a 12 mg/kg/ocasião no Dia 1 do estudo de toxicidade intravenosa. Aumentando a dose de anti-EGFR acima de 4,5 mg/kg/ocasião é provável resultar em uma exposição sistêmica mais alta do que seria prognosticado a partir de um relacionamento linear, que é compatível com a possibilidade de um processo limitado de capacidade para a eliminação de anti-EGFR.

[0293] Além disso, o estudo também forneceu evidência que em geral não houve nenhuma diferença na exposição sistêmica de macacos machos e fêmeas a anti-EGFR e que houve acúmulo depois da administração intravenosa repetida.

Introdução

[0294] Três grupos de um macaco-carangueiro macho e um fêmea foram administrados com anti-EGFR por injeção de bolus intravenosa, em níveis de dose de 1,5, 4,5 e 12 mg/kg/ocasião nos Dias 1, 8, 15 e 22 de um estudo de toxicidade preliminar. Amostras de sangue foram tiradas de cada animal nos pontos no tempo seguintes a seguir da administração no Dia 1: 1, 4, 12, 24, 72 e 120 horas pós-dose.

Além disso, as amostras foram tomadas pré-dose e em 1 hora pós-dose nos Dias 8, 15 e 22 e em 672 horas depois da primeira dose no Dia 1. O soro separado foi congelado em cerca de -20° C antes da análise de concentrações séricas de anti-EGFR por um método de imunoensaio.

Abreviações

AUC	Área sob a curva de concentração sérica-tempo ao tempo infinito
AUC ₁₆₈	Área sob a curva de concentração sérica-tempo durante um intervalo de dosagem de 168 horas
BLQ	Abaixo do limite de quantificação
ca	Aproximadamente
CL	Liberação de soro total
Cmax	Concentração sérica máxima
F	Fêmea
k	Constante de taxa terminal
M	Macho
t _½	Meia-vida terminal
Tmax	Time no qual Cmax ocorreu
Vss	Volume de distribuição no estado estacionário

Anticorpo usado para o estudo

[0295] Glyco-mAb (Anti-EGFR), um anticorpo anti-EGFR engençado em Fc para afinidade de ligação do receptor Fc-FcgamaRIII aumentada e ADCC aumentada, foi produzido, purificado e caracterizado como descrito acima. Brevemente, o anticorpo foi produzido por co-transfecção de células HEK-293-EBNA com vetores de DNA de plasmídeo para a expressão da cadeia pesada de anticorpo I-HHB, cadeia leve de anticorpo I-KC, GnT-III e ManII. Uma versão linearmente aumentada do método de transfecção descrito acima foi utilizada, monocamadas de célula de transfecção cultivadas em garrafas cilíndricas

ao invés de frascos T. Uma etapa cromatográfica de troca de ânion de fluxo atravessante adicional usando matriz de Q-sefase foi incluída no processo de purificação imediatamente antes da etapa cromatográfica de exclusão por tamanho descrita acima.

[0296] O padrão de glicosilação do anticorpo engendrado em Fc foi analisado como descrito acima usando espectrometria de MALDI/TOF-MS de oligossacarídeos derivados de Fc enzimaticamente liberados. O perfil de oligossacarídeo é mostrado na figura 23.

[0297] A ligação ao EGFR humano e EGFR de macaco foi demonstrada por ligação de célula inteira como descrito acima usando células A431 e COS-7, respectivamente, e análise com base em FACS. As curvas de ligação são mostradas nas figuras 24 e 25 respectivamente.

[0298] A ligação do receptor FcgamaRIII aumentada que resulta da engenharia de Fc aplicada foi demonstrada como descrito acima usando ligação de célula inteira às células CHO engendradas para a expressão superficial de FcgamaRIII humano e análise com base em FACS. Os resultados são mostrados na figura 26. Adicionalmente, o anticorpo engendrado tem grau equivalente de engenharia de Fc ao anticorpo "Glyco-2" (75 % em oligossacarídeos de Fc sendo do tipo não fucosilado) descrito em outra parte (Ferrara, C. et al., J Biol Chem. 5 de Dez de 2005; [E-publication ahead of print]). Tais anticorpos engendrados em Fc têm até 50 vezes a afinidade de ligação aumentada para FcgamaRIII humano em relação a um anticorpo não engendrado em Fc padrão (Constante de dissociação no equilíbrio de 15 e 150 nM para as variantes polimórficas 158V e 158F do receptor humano vs. 750 e 5000 nM para as mesmas variantes do receptor, respectivamente, quando da ligação aos anticorpos de IgG1 humana não engendrados em Fc).

[0299] ADCC foi medido como descrito acima usando duas linhagens de célula alvo: células de carcinoma pulmonar humano A549 e

células de queratinócito de macaco-caranguejeiro CYNOM-K1. Os resultados são mostrados nas figuras 27 e 28, respectivamente.

Processamento de dados

[0300] Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando o programa de computador WinNonlin Pro versão 3.3 (Pharsight Corporation, USA).

[0301] Todas as concentrações séricas fornecidas como parte deste estudo foram relatadas para 4 figuras significantes ou 3 posições decimais. Os parâmetros farmacocinéticos foram relatados como segue: Cmax, AUC₁₆₈, CL e Vss para 4 figuras significantes; k para 4 posições decimais; t_½ para 1 posição decimal.

[0302] Os valores que foram BLQ (< 0,195 µg/mL) foram introduzidos como zero no processamento farmacocinético.

Toxicocinéticos

[0303] Concentrações séricas máximas de anti-EGFR (Cmax) e seus tempos de ocorrência (Tmax) foram os valores observados. As áreas sob as curvas de concentração-tempo de anti-EGFR sérico dentro de um intervalo de dosagem de 168 horas (AUC₁₆₈), foram estimados pela regra trapezoidal linear. No cálculo de valores de AUC₁₆₈ as concentrações de anti-EGFR séricas em zero hora foram estimadas por extração reversa usando análise de regressão linear de log, com base nos primeiros dois tempos de amostragem, entretanto, se a concentração sérica não diminuiu durante este período então a concentração sérica em zero hora foi considerada ser equivalente à concentração no primeiro tempo de amostragem. As áreas sob as curvas de concentração-tempo de anti-EGFR sérico ao tempo infinito (AUC), foram estimadas pela expressão seguinte:

$$\text{AUC} = \text{AUC}_{168} + \text{Clast}/k$$

[0304] Onde Clast é a concentração sérica prognosticada no último ponto de amostra quantificável e k é a constante de taxa terminal.

[0305] As constantes de taxa terminal (k) foram estimadas ajustando-se uma regressão linear de concentração de log contra o tempo. Para a estimativa de k ser aceita como confiável, os critérios seguintes foram impostos:

1. Os pontos de dados terminais foram aparentemente distribuídos aleatoriamente em torno de uma única linha reta (na inspeção visual)
2. Um mínimo de 3 pontos de dados estava disponível para a regressão
3. O coeficiente de regressão foi $\geq 0,95$, e a fração da variância considerada foi $\geq 0,90$
4. O intervalo incluindo os pontos de dados escolhidos para a regressão foi pelo menos duas vezes maior do que a meia-vida por si só

[0306] Meias-vidas terminais ($t_{1/2}$) foram calculadas como $\ln 2/k$. A liberação de soro total (CL) foi calculada como Dose/AUC. O volume de distribuição no estado estacionário (Vss) foi calculado como Dose.AUMC/AUC². O acúmulo (R) foi avaliado como a razão da concentração mínima a seguir da última dose (Dia 22) para a concentração mínima a seguir da primeira dose (Dia 1) isto é a concentração sérica em 672 horas/concentração sérica em 168 horas (pré-dose no Dia 8).

Resultados e Debate

[0307] Amostras de sangue foram tiradas até 120 horas depois da dosagem no Dia 1; na pré-dose e 1 hora pós-dose nos Dias 8, 15 e 22, e em 672 horas pós dosagem no Dia 1 durante um estudo de toxicidade para avaliar a exposição sistêmica de macacos machos e fêmeas a anti-EGFR a seguir da administração de bolus intravenosa de anti-EGFR em níveis de dose de 1,5, 4,5 e 12 mg/kg/ocasião nos Dias 1, 8, 15 e 22 do estudo. As concentrações séricas de anti-EGFR em amostras tiradas até 168 horas pós-dose são apresentadas nas Tabelas 27 a 29, e os perfis de concentração sérica-tempo médios são ilustrados nas figuras 18 e 19.

[0308] Parâmetros farmacocinéticos de anti-EGFR são apresentados na Tabela 50, e os valores de AUC₁₆₈ são resumidos abaixo:

Tabela 24

Nível de dose (mg/kg/ocasião)	AUC168 ($\mu\text{g.h/mL}$)	
	Machos	Fêmeas
1,5	830,4	748,4
4,5	2537	2378
12	18310	15980

[0309] Os tempos nos quais as concentrações séricas máximas ocorreram (T_{\max}) foram geralmente 1 hora pós-dose (o primeiro ponto de amostra) mas ocorreram em 4 horas pós-dose (o segundo ponto de amostra) em fêmeas 2F462 (4,5 mg/kg) e 3F612 (12 mg/kg). Entretanto, para ambas estas fêmeas, as concentrações em 4 horas pós-dose foram muito similares àquelas concentrações em 1 hora pós-dose e estavam provavelmente dentro da variabilidade do ensaio. Portanto o retardo aparente em T_{\max} é improvável ser de qualquer importância.

[0310] As concentrações séricas de anti-EGFR antes da dose subsequente foram quantificáveis em todos os animais exceto no macho 2M461 no Dia 22 (4,5 mg/kg/ocasião de nível de dose) portanto, em geral, os animais foram continuamente expostos a concentrações quantificáveis de anti-EGFR durante um intervalo de dosagem.

[0311] Os relacionamentos entre áreas sob as curvas de concentração-tempo de anti-EGFR sérico (AUC₁₆₈) e nível de dose no Dia 1 são apresentados abaixo:

Tabela 25

Nível de dose (mg/kg/ocasião)	Nível de dose razão	Razão de AUC ₁₆₈	
		Machos	Fêmeas
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

[0312] A taxa e extensão da exposição sistêmica de macacos a anti-EGFR, caracterizada por AUC_{168} , aumentaram aproximada e proporcionalmente com a dose crescente sobre a faixa de dose de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasião mas em mais do que o aumento de dose proporcional sobre a faixa de dose de 4,5 a 12 mg/kg/ocasião no Dia 1. Na dose mais alta (12 mg/kg/ocasião) o AUC_{168} foi cerca de 2,8 vezes mais alto do que aquele prognosticado por um relacionamento linear (figura 20).

[0313] A extensão (AUC_{168}) da exposição sistêmica de macacos fêmeas a anti-EGFR foi geralmente similar à exposição em macacos machos.

[0314] Depois de doses intravenosas repetidas, as concentrações séricas de pré-dose de anti-EGFR foram geralmente mais altas do que aqueles valores depois de uma dose única (figuras 21 a 22) e indicaram acúmulo de anti-EGFR no soro por todo o período do estudo. Este acúmulo foi geralmente mais baixo em fêmeas do que em machos, exceto no nível de dose mais alto. As razões das concentrações mínimas (pré-dose) a seguir da última dose no Dia 22 (672 horas depois da dose do Dia 1) para a concentração mínima a seguir da primeira dose no Dia 1 são apresentadas na Tabela 26, abaixo:

Tabela 26

Nível de dose (mg/kg/ocasião)	R	
	Machos	Fêmeas
1,5	2,23	1,26
4,5	*	1,32
12	1,94	2,72

*Pode não ser calculado visto que a concentração mínima foi BLQ

[0315] As constantes de taxa terminal (k), e meias-vidas terminais correspondentes ($t_{1/2}$), de anti-EGFR no Dia 1 são apresentadas

na Tabela 30. A meia-vida terminal pode não ser estimada adequadamente para todos os animais, mas onde ela pode ser estimada estava na faixa de 32,5 a 63,1 horas, e pareceu aumentar com a dose em animais machos. A liberação de soro total de anti-EGFR pareceu ser independente da dose sobre a faixa de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasião mas foi reduzida no nível de dose mais alto em macacos machos e fêmeas.

[0316] Em conclusão, a extensão da exposição sistêmica de macacos-carangueiros a anti-EGFR pareceu ser caracterizada por cinética não linear (dependente de dose) sobre a faixa de dose de 1,5 a 12 mg/kg/ocasião no Dia 1 do estudo de toxicidade intravenosa. Aumentando a dose de anti-EGFR acima de 4,5 mg/kg/ocasião é provável resultar em uma exposição sistêmica mais alta do que seria prognosticado a partir de um relacionamento linear, que é compatível com a possibilidade de um processo limitado de capacidade para a eliminação de anti-EGFR.

[0317] Além disso, o estudo também forneceu evidência que em geral não houve nenhuma diferença na exposição sistêmica de macacos machos e fêmeas a anti-EGFR e que houve acúmulo depois da administração intravenosa repetida.

Tabela 27

Concentrações séricas ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR em soro de macaco a seguir da administração intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR nos Dias 1, 8, 15 e 22

Ponto no tempo	Número do animal	
	1M 623	1F 590
Dia 1 1 hora	33,42	30,86
Dia 1 4 horas	27,33	27,49
Dia 1 12 horas	13,09	17,01
Dia 1 24 horas	9,656	9,468

Ponto no tempo	Número do animal	
	1M 623	1F 590
Dia 1 72 horas	2,528	0,786
Dia 1 120 horas	0,845	0,431
Dia 8 pré-dose	0,538	0,287
Dia 8 1 hora	30,02	19,07
Dia 15 pré-dose	0,902	0,382
Dia 15 1 hora	17,91	33,08
Dia 22 pré-dose	1,065	0,595
Dia 22 1 hora	19,41	33,00
Dia 1 672 horas	1,202	0,362

Tabela 28

Concentrações séricas ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR em soro de macaco-caranguejeiro a seguir da administração intravenosa de 4,5 mg/kg de anti-EGFR nos Dias 1, 8, 15 e 22

Ponto no tempo	Número do animal	
	2M 461	2F 462
Dia 1 1 hora	32,45	29,51
Dia 1 4 horas	32,39	29,57
Dia 1 12 horas	28,05	25,88
Dia 1 24 horas	23,70	23,78
Dia 1 72 horas	14,03	14,38
Dia 1 120 horas	10,42	8,137
Dia 8 pré-dose	4,672	3,683
Dia 8 1 hora	25,91	31,06
Dia 15 pré-dose	5,752	5,450
Dia 15 1 hora	32,20	35,38
Dia 22 pré-dose	BLQ	6,497
Dia 22 1 hora	26,98	30,23
Dia 1 672 horas	BLQ	4,845

Tabela 29

Concentrações séricas ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR em soro de macaco-caranguejeiro a seguir da administração intravenosa de 12 mg/kg de anti-EGFR nos Dias 1, 8, 15 e 22

Ponto no tempo	Número do animal	
	1M 623	IF 590
Dia 1 1 hora	262,2	168,0
Dia 1 4 horas	223,3	174,5
Dia 1 12 horas	164,9	165,7
Dia 1 24 horas	141,7	146,0
Dia 1 72 horas	99,54	86,64
Dia 1 120 horas	86,64	69,08
Dia 8 pré-dose	65,86	45,21
Dia 8 1 hora	282,1	209,9
Dia 15 pré-dose	98,43	71,21
Dia 15 1 hora	385,9	231,4
Dia 22 pré-dose	117,3	105,6
Dia 22 1 hora	234,1	402,5
Dia 1 672 horas	127,5	122,9

Tabela 30

Parâmetros farmacocinéticos de anti-EGFR no Dia 1 da administração intravenosa semanal de anti-EGFR aos macacos-carangueeiros

Dose (mg/kg)	Animal	C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	T_{ma} (h)	AUC_t ($\mu\text{g.h/mL}$)	AUC ($\mu\text{g.h/mL}$)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (mL/kg)	k (1/h)	$t_{1/2}$ (h)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1.488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1.663	133,2	0,121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a

^a O valor é uma estimativa visto que os dados não satisfizeram todos

os critérios de aceitação definidos no Processamento de Dados e deve ser tratado com cautela

Química do Sangue e Hematologia

[0318] Amostras de sangue foram tiradas da veia femoral de macacos cinomolgos que foram administrados com uma injeção de bolus intravenosa de anti-EGFR GlycoMAB nos dias 1, 8, 15, e 22. As amostras foram tiradas do membro não usado para a administração da dose, a seguir da privação noturna de alimento (nenhum falecido). As amostras foram examinadas no pré-tratamento, três dias depois da segunda dose, e na finalização quanto aos parâmetros seguintes, usando heparina de lítio como anticoagulante:

Fosfatase alcalina
Alanina amino-transferase
Aspartato amino-transferase
Bilirrubina - total
Uréia
Creatinina
Glicose
Colesterol - total
Triglicerídeos
Sódio
Potássio
Cloreto
Cálcio
Fósforo
Proteína total
Eletroforetograma de proteína
Razão de albumina/globulina

[0319] Os dados de análise da química do sangue de macaco-caranguejeiro normal médios são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31

Macacos-caranguejeiros (origem Mauritius) -- Química do sangue

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
ALP	M	949	837	1339	2147	3201	3899	2175,5	565,44
	F	881	946	1342	2144	3163	3740	2164,1	552,82
ALP-N	M	511	481	579	881	1453	1771	928,0	260,88
	F	499	427	546	846	1362	1694	879,5	240,24
ALT	M	1489	24	30	50	87	127	53,7	19,07
	F	1407	23	28	46	84	111	49,3	18,65
AST	M	1487	26	30	41	63	101	43,6	17,57
	F	1404	25	29	39	61	89	41,7	13,59
gGT	M	663	95	118	178	292	342	188,5	52,47
	F	641	81	102	153	232	266	158,6	38,38
LAP	M	207	18	26	40	79	217	45,1	28,25
	F	205	15	20	35	62	89	37,1	12,73
GLDH	M	159	8	10	17	35	126	20,1	16,46
	F	159	6	8	15	27	35	16,3	5,97
Bilirrubina	M	1494	1	1	3	8	11	3,8	2,04
	F	1413	1	2	4	8	11	4,1	2,07
LDH	M	99	160	596	808	1166	2029	838,3	218,75
	F	82	477	529	711	945	1021	715,0	117,07
CPK	M	331	68	83	179	713	1867	287,4	464,03
	F	335	57	77	184	925	2628	309,7	534,02
bili indir	M	59	1	2	4	10	11	4,2	2,15
	F	57	1	2	4	5	7	3,6	1,13
bilirrubina direta	M	59	0	0	0	2	3	0,2	0,65
	F	57	0	0	0	1	3	0,2	0,52

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
ácidos biliares	M	386	0,9	2,5	6,4	15,3	23,4	7,38	4,574
	F	380	1,4	3,0	7,0	12,9	17,8	7,41	3,474
uréia	M	1457	3,01	3,66	5,50	8,81	10,53	5,775	1,5710
	F	1379	2,77	3,42	5,33	8,56	9,90	5,559	1,5432
creatí-nina	M	1458	55	59	71	87	94	71,6	8,67
	F	1383	56	60	72	87	85	72,7	8,36
glicose	M	1455	2,22	2,64	3,71	5,21	6,37	3,809	0,8135
	F	1380	2,23	2,65	3,63	5,18	6,34	3,735	0,7990
coleste- rol	M	1455	1,69	1,93	2,68	3,55	3,96	2,706	1,4909
	F	1382	1,83	2,15	2,86	3,69	4,05	2,885	0,4813
col HDL	M	45	1,26	1,34	1,79	2,23	2,59	1,784	0,3128
	F	45	1,09	1,31	1,82	2,43	2,55	1,844	0,3179
col VLDL	M	45	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11	0,004	0,0175
	F	45	0,00	0,00	0,00	0,12	0,19	0,012	0,0370
NEFA	M	132	0,10	0,28	0,98	1,84	2,44	0,994	0,4700
	F	132	0,14	0,22	1,06	1,90	2,18	1,070	0,4704
triglice- rídeos	M	1453	0,26	0,32	0,53	0,86	1,30	0,561	0,2051
	F	1374	0,26	0,34	0,57	0,90	1,14	0,587	0,1778
Ph lipídeo	M	64	1,65	1,68	2,18	2,91	3,15	2,254	0,3769
	F	49	1,77	1,83	2,44	2,91	2,98	2,405	0,3267
ácido úrico	M	17	0	0	0	8	8	1,1	2,34
	F	17	0	0	0	1	1	0,4	0,51

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
Na	M	1461	141	142	147	152	155	146,8	3,00
	F	1382	140	142	147	153	157	147,3	3,34
K	M	1460	3,2	3,4	4,0	5,0	5,6	4,08	0,511
	F	1382	3,2	3,3	4,0	4,9	5,4	4,01	0,484
Cl	M	1461	102	104	108	112	115	107,7	2,71
	F	1382	102	104	108	113	116	108,4	2,83
Ca	M	1462	2,31	2,39	2,56	2,76	2,87	2,568	0,1176
	F	1382	2,32	2,39	2,57	2,77	2,89	2,572	0,1168
Phos	M	1172	1,16	1,40	1,93	2,43	2,69	1,921	0,3126
	F	1098	1,17	1,37	1,84	2,35	2,60	1,844	0,2978
colesterol LDL	M	45	0,54	0,62	1,20	1,87	1,92	1,253	0,3694
	F	45	0,69	0,78	1,19	1,83	1,88	1,233	0,2906
bicarbonato	M	288	7	10	17	22	25	16,5	3,51
	F	283	6	10	16	22	25	15,9	3,81
proteína total	M	1455	71	74	80	87	90	80,2	4,06
	F	1381	71	74	81	89	92	81,2	4,32
albúmina (química)	M	346	34	38	43	46	49	42,6	2,67
	F	342	36	38	43	47	49	42,7	2,60
albúmina	M	1089	33	36	45	51	54	44,3	4,46
	F	1019	34	37	45	52	55	44,7	4,58
globulina	M	289	31	32	36	41	45	36,3	2,83
	F	285	30	32	37	43	48	37,5	3,59

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
razão de A/G (química)	M	340	0,79	0,98	1,17	1,39	1,45	1,172	0,1215
	F	336	0,84	0,95	1,14	1,34	1,42	1,143	0,1274
razão de A/G	M	1068	0,68	0,80	1,26	1,65	1,82	1,252	0,2522
	F	998	0,67	0,79	1,26	1,66	1,81	1,247	0,2647
A1 globulina	M	1105	2	2	3	4	4	2,8	0,62
	F	1035	2	2	3	4	5	2,8	0,64
A2 globulina	M	1105	3	3	4	6	7	4,2	0,92
	F	1035	3	3	4	6	7	4,2	1,01
beta Globulina	M	1105	12	13	16	22	24	16,6	2,63
	F	1035	12	13	16	22	25	16,8	2,85
gama Globulina	M	1105	8	9	12	17	18	12,6	2,26
	F	1035	8	9	13	17	20	13,1	2,52
Aldolase	M	96	9	14	21	38	57	22,0	7,48
	F	97	10	13	19	48	84	21,9	11,91
CHE plasmático	M	17	4159	4159	5745	9160	9160	5919,8	1181,68

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
	F	17	3371	3371	5869	8367	8367	5689,2	1512,98
CRP	M	57	0,000 0	0,000	0,002	0,013	0,026	0,0032	0,00414
	F	56	0,000 0	0,000	0,002	0,004	0,007	0,0017	0,00167
T3	M	40	1,90	1,90	2,50	3,38	3,58	2,537	0,4011
	F	40	1,71	1,96	2,59	3,06	4,02	2,631	0,3799
T4	M	40	35	42	59	86	92	59,7	11,84
	F	40	38	40	56	81	107	58,6	14,37

[0320] As amostras para a análise hematológica, do sangue periférico foram tiradas da veia femoral de macaco-caranguejeiro que foi administrado com uma injeção de bolus intravenosa de anti-EGFR GlycoMAB nos dias 1, 8, 15, e 22. As amostras foram tiradas, do membro não usado para a administração da dose, a seguir da privação noturna de alimento (nenhum falecido). As amostras foram examinadas no pré-tratamento, três dias depois da segunda dose, e na finalização quanto aos parâmetros seguintes:

1) Usando EDTA como anticoagulante -

Concentração de Hematócrito e Hemoglobina

Contagem de Eritrócito

Reticulócitos

Hemoglobina celular média

Concentração de hemoglobina celular média

Volume celular médio

Contagem de leucócito total

Contagem de leucócito diferencial

Contagem de plaqueta

Anormalidades da morfologia do sangue

Anisocitose

Microcitose

Macrocitose

Hipocromasia

Hiperchromasia

2) Usando citrato como anticoagulante -

Tempo de protrombina

Tempo de tromboplastina parcial ativo

[0321] Os dados de análise da hematologia de macaco-caranguejeiro normais médios são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32

Macacos-carangueeiros (origem Mauritius) -- Hematologia

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
HCT	M	1495	0,385	0,401	0,443	0,488	0,512	0,4435	0,02776
	F	1426	0,376	0,399	0,442	0,489	0,508	0,4424	0,02947
Hemoglobina	M	1495	11,4	12,1	13,3	14,5	15,1	13,31	0,769
	F	1426	11,2	11,9	13,2	14,5	15,1	13,21	0,855
RBC	M	1495	5,67	6,04	6,74	7,51	7,92	6,744	0,4792
	F	1426	5,58	5,96	6,71	7,45	7,73	6,707	0,4894
Retic (1)%	M	20	0,1	0,1	0,4	1,8	1,8	0,48	0,438
	F	20	0,1	0,1	0,3	0,9	0,9	0,42	0,268
Retic (2)%	M	1476	0,21	0,27	0,49	0,95	1,58	0,551	0,3804
	F	1408	0,22	0,28	0,54	1,06	1,60	0,595	0,2934
MCH	M	1495	17,0	17,8	19,8	21,6	22,5	19,80	1,432
	F	1425	16,7	17,7	19,7	21,8	22,6	19,74	1,216
MCHC	M	1495	27,2	28,2	30,1	31,9	32,7	30,06	1,801
	F	1425	27,0	27,9	29,9	31,8	32,6	29,88	1,174
MCV	M	1495	57,9	60,5	65,8	71,4	73,5	65,88	3,278
	F	1425	58,3	60,4	66,0	71,7	74,5	66,07	3,353
RDW	M	280	12,6	12,9	14,4	16,1	16,7	14,40	0,934

Parâmetro	sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	média	s.d.
	F	285	12,4	12,8	14,2	15,7	16,3	14,21	0,879
WBC	M	1507	5,61	6,62	10,52	18,59	30,24	11,372	4,7766
	F	1432	5,39	6,58	10,62	19,55	28,79	11,637	4,7307
neutrófilos	M	1507	0,88	1,28	3,49	10,24	16,27	4,319	3,1741
	F	1432	1,06	1,62	4,45	12,27	17,41	5,392	3,4777
linfócitos	M	1507	2,19	2,96	5,53	9,81	15,91	6,021	3,4066
	F	1432	2,16	2,67	4,86	8,55	13,95	5,265	2,9997
eosinófilos	M	1507	0,00	0,01	0,17	0,81	1,49	0,254	0,3127
	F	1432	0,00	0,01	0,14	0,73	1,55	0,232	0,3188
basófilos	M	1507	0,01	0,02	0,04	0,10	0,25	0,053	0,627
	F	1432	0,01	0,02	0,04	0,10	0,21	0,051	0,0540
monócitos	M	1507	0,17	0,25	0,51	1,03	1,45	0,562	0,2575
	F	1432	0,16	0,23	0,49	1,04	1,56	0,547	0,2705
células não manchadas grandes	M	1507	0,04	0,06	0,14	0,32	0,60	0,163	0,1330
	F	1432	0,04	0,06	0,13	0,29	0,50	0,148	0,1147
plaque-tas	M	1495	158	238	359	497	575	362,1	81,69
	F	1426	181	234	359	496	560	360,5	80,04
PT	M	1481	9,6	9,9	10,8	12,0	14,8	10,88	0,877
	F	1406	9,7	10,0	10,8	12,1	14,1	10,93	0,847
Act PTT	M	1483	23,1	24,4	29,1	37,9	50,1	30,06	5,267
	F	1408	22,8	24,4	29,4	37,4	47,2	30,19	5,185
fibrinogênio	M	265	1,61	1,86	2,61	3,51	4,88	2,664	0,6178
	F	252	1,58	1,84	2,43	3,27	3,89	2,487	0,4545

[0322] Os Valores Individuais Cumulativos de Bioquímica para os

macacos são apresentados nas Tabelas 33a a h, abaixo

Tabela 33a

número do ani- mal	gru- po/s exo	código occn.	ALP U/L	AL T U/L	AST U/L	Bili μmo I/L	Uréia mmol/ L	Creat μmol/ L	Glic mmol/ L	Col mmol/ L
615	1M	PT	740	36	39	3	5,35	69	3,65	2,34
		D11	743	35	33	3	5,43	73	3,66	2,00
		TERM	597	29	31	2	5,16	76	3,74	2,30
465	2M	PT	647	44	33	3	5,73	70	4,69	2,50
		PD	775	47	36	2	3,60	73	4,50	2,72
		D11	655	74	46	5	4,34	74	3,35	2,64
639	2M	TERM	768	48	38	3	4,42	73	3,67	2,54
		PD	741	29	26	2	4,41	87	3,31	3,22
		D11	629	29	28	3	3,87	99	2,64	2,99
613	3M	TERM	599	34	22	2	3,62	83	3,46	2,45
		PT	1003	37	31	5	3,80	90	5,72	2,61
		D11	793	36	29	4	4,45	80	3,28	2,70
631	4M	TERM	931	34	32	5	5,16	83	2,78	2,46
		PD	590	34	37	2	3,43	83	3,92	2,49
		D11	508	38	36	3	3,33	82	3,38	2,30
		TERM	578	25	25	2	4,00	89	3,70	2,26

Tabela 33b

número do animal	gru- po/s exo	códi- go occn.	Trig mm ol/L	Na mm ol/L	K mm ol/L	Cl mm ol/L	Ca mmo I/L	Phos mmol/ L	Prot Total g/L	Alb gl/L
615	1M	PT	0,24	146	4,7	108	2,54	1,77	91	35
		D11	0,39	145	3,9	106	2,55	1,85	94	41
		TERM	0,34	147	4,2	107	2,47	1,63	87	38
465	2M	PT	0,74	147	3,7	108	2,71	1,32	81	37
		PD	0,93	147	4,1	109	2,70	1,54	84	46
		D11	0,66	151	3,9	111	2,70	1,98	83	39
639	2M	TERM	0,51	146	3,6	105	2,67	1,85	80	40
		PD	0,27	146	4,2	107	2,68	1,85	84	44
		D11	0,32	150	4,8	108	2,81	2,07	85	42
		TERM	0,38	146	4,5	107	2,70	2,03	74	39

número do animal	gru- po/s exo	códi- go occn.	Trig mm ol/L	Na mm ol/L	K mm ol/L	Cl mm ol/L	Ca mmo l/L	Phos mmol/ L	Prot Total g/L	Alb gl/L
613	3M	PT	0,47	151	4,5	106	2,75	1,85	83	41
		D11	0,44	147	4,2	106	2,69	1,76	80	45
		TERM	0,69	147	4,3	106	2,63	1,62	76	40
631	4M	PD	0,45	149	4,2	107	2,67	2,00	87	46
		D11	0,77	151	5,0	112	2,68	2,00	84	39
		TERM	0,64	150	4,7	107	2,77	1,89	86	46

Tabela 33c

número do ani- mal	gru- po/s exo	códi- go occn.	a1 g/L	a2 g/L	Beta g/L	Ga ma g/L	Ra- zão A/G	Alb %	a1 %	a2 %
615	1M	PT	3	5	25	23	0,63	39,0	3,4	5,1
		D11	3	4	22	25	0,77	43,1	3,0	4,5
		TERM	3	4	21	21	0,78	43,5	3,3	4,9
465	2M	PT	4	5	22	13	0,84	45,7	4,5	5,9
		PD	3	4	18	12	1,21	54,9	3,6	5,0
		D11	4	5	20	15	0,89	46,7	4,9	6,4
639	2M	PT	3	5	17	14	1,10	52,9	3,5	5,8
		D11	3	6	18	16	0,98	49,1	4,1	6,6
		TERM	3	4	17	11	1,11	52,2	3,7	6,0
613	3M	PT	4	4	20	14	0,98	49,5	5,0	4,7
		D11	3	3	17	13	1,29	55,8	3,7	3,7
		TERM	3	3	15	14	1,11	53,0	4,6	3,9
631	4M	PT	3	4	18	16	1,12	53,3	3,6	4,3
		D11	4	4	19	18	0,87	46,4	4,4	4,4
		TERM	3	4	19	15	1,15	53,1	3,4	4,3

Tabela 33d

número do animal	grupo/sexo	código occn.	Beta g/L	Gama g/L
615	1M	PT	27,3	25,3
		D11	23,2	26,2
		TERM	24,4	23,9

número do animal	grupo/sexo	código occn.	Beta g/L	Gama g/L
465	2M	PT	27,4	16,6
		PD	21,8	14,7
		D11	24,0	17,9
		TERM	25,5	14,2
639	2M	PD	20,7	17,0
		D11	21,5	18,7
		TERM	23,2	14,9
613	3M	PT	24,5	16,3
		D11	21,0	15,8
		TERM	20,0	18,5
631	4M	PD	20,7	18,0
		D11	22,8	22,0
		TERM	22,1	17,1

Tabela 33e

número do animal	gru- po/s exo	códi- go occn.	AL P U/L	ALT U/L	AS T U/L	Bili μm ol/L	Uréia mmol /L	Creat μmol/ L	Glic mmol/ L	Col mmol/ L
614	1F	PT	687	71	50	3	4,92	60	4,45	2,77
		D11	576	63	44	2	5,22	63	4,32	2,73
		TERM	517	59	41	3	4,78	70	3,98	2,83
652	1F	PT	598	43	25	3	7,26	69	3,26	2,42
		D11	540	40	28	3	6,94	78	3,28	2,46
		TERM	511	40	27	4	6,78	80	3,46	2,38
624	2F	PD	533	56	35	3	3,85	73	3,91	2,31
		D11	410	40	34	13	4,18	78	2,72	2,56
		TERM	432	41	25	3	3,70	78	3,30	2,16
632	3F	PT	559	35	34	5	5,44	80	3,08	2,47
		D11	510	37	31	5	4,36	85	3,89	2,61
		TERM	428	37	34	5	5,32	88	3,10	2,63
640	4F	PD	343	23	32	4	4,09	65	3,46	1,24
		D11	292	25	28	4	4,12	63	2,69	1,13
		TERM	266	22	27	2	4,55	69	3,69	1,00

Tabela 33f

número do ani- mal	gru- po/s exo	códi- go occn.	Trig mm ol/L	Na mm ol/L	K mm ol/L	Cl mm ol/L	Ca mm ol/L	Phos mmol /L	Prot Total g/L	Alb gl/L
614	1F	PT	0,37	148	4,6	109	2,69	2,03	80	39
		D11	0,33	147	4,1	109	2,72	2,08	82	43
		TERM	0,54	148	3,6	108	2,59	1,84	80	41
652	1F	PT	0,57	147	4,3	105	2,58	1,52	78	35
		D11	0,43	149	4,7	108	2,74	1,80	88	43
		TERM	0,59	149	4,4	108	2,59	1,51	80	40
624	2F	PD	0,60	145	4,1	108	2,54	1,50	77	40
		D11	0,51	148	4,0	111	2,58	1,42	77	39
		TERM	0,43	146	3,9	108	2,56	1,46	76	44
632	3F	PT	0,31	151	4,5	109	2,48	1,72	76	34
		D11	0,34	149	4,6	109	2,58	1,85	80	39
		TERM	0,49	150	4,5	111	2,55	1,47	78	38
640	4F	PD	0,36	144	4,8	111	2,31	1,45	68	29
		D11	0,31	145	4,3	112	2,24	1,53	63	25
		TERM	0,27	144	4,7	108	2,20	1,33	60	25

Tabela 33g

número do ani- mal	gru- po/se xo	códi- go occn.	a1 g/ L	a2 g/L	Beta g/L	Ga ma g/L	Ra- zão A/G	Alb %	a1 %	a2 %
614	1F	PT	4	5	20	13	0,95	49,2	4,4	5,9
		D11	3	4	19	13	1,10	52,7	3,3	4,9
		TERM	3	4	18	13	1,05	51,7	3,8	5,2
652	1F	PT	4	5	19	15	0,81	45,1	4,6	5,9
		D11	3	5	20	17	0,96	49,3	3,4	5,5
		TERM	4	5	18	14	1,00	49,4	4,7	6,2
624	2F	PD	3	4	16	14	1,08	52,2	4,1	5,4
		D11	4	4	17	14	1,03	50,1	4,9	5,5
		TERM	3	4	15	10	1,38	58,5	3,4	5,3
632	3F	PT	4	4	19	15	0,81	44,7	5,1	5,0
		D11	3	4	17	16	0,95	49,2	4,2	4,7
		TERM	4	4	17	15	0,95	49,2	4,6	4,9

número do mal	gru- po/sexo	códi- go occn.	a1 g/ L	a2 g/L	Beta g/L	Ga- ma g/L	Ra- zão A/G	Alb %	a1 %	a2 %
640	4F	PD	4	4	17	15	0,74	42,2	5,7	5,6
		D11	4	3	17	13	0,66	40,1	6,6	5,5
		TERM	4	3	16	13	0,71	41,4	6,4	4,6

Tabela 33h

número do animal	grupo/sexo	código occn.	Beta %	Gama %
614	1F	PT	24,8	15,7
		D11	23,1	16,0
		TERM	22,8	16,5
652	1F	PT	24,7	19,7
		D11	22,3	19,4
		TERM	22,1	17,6
624	2F	PD	20,7	17,6
		D11	21,6	18,0
		TERM	19,9	12,9
632	3F	PT	24,9	20,2
		D11	21,5	20,4
		TERM	21,8	19,5
640	4F	PD	24,9	21,6
		D11	26,9	20,9
		TERM	26,5	21,1

[0323] Os Valores Individuais Cumulativos de Hematologia para os macacos são apresentados nas Tabelas 34a a I, abaixo:

Tabela 34a

núme- ro do animal	gru- po/sex o	código occn.	Hct L/L	Hb g/dL	RBC x10 ¹² / L	Retic %	MCH pg	MCHC g/dL	MCV fL
615	1M	PT	0,389	12,4	5,94	0,38	20,9	31,9	65,5
		D11	0,366	11,5	5,59	0,76	20,6	31,4	65,5
		TERM	0,381	11,8	5,91	0,25	20,0	31,0	64,5

núme-	gru-	código	Hct L/L	Hb	RBC	Retic	MCH	MCHC	MCV
ro	do	po/sex	occn.	g/dL	x10 ¹² /L	%	pg	g/dL	fL
animal	o				L				
465	2M	PT	0,439	13,2	6,76	0,56	19,5	30,1	65,0
		PTR							
		PD	0,460	13,7	7,22	0,50	19,0	29,9	63,8
		D11	0,391	11,7	6,11	1,62	19,1	29,9	64,0
639	2M	TERM	0,441	13,6	6,93	0,65	19,7	30,9	63,7
		PD	0,419	12,7	6,23	0,51	20,4	30,3	67,2
		D11	0,400	11,7	5,99	0,52	19,6	29,3	66,7
613	3M	TERM	0,388	12,2	5,70	1,14	21,4	31,4	68,1
		PT	0,461	14,1	6,79	0,48	20,7	30,5	67,8
		PTR							
		D11	0,396	12,7	6,05	0,92	21,0	32,1	65,4
		TERM	0,410	12,9	6,23	0,49	20,8	31,5	65,9

Tabela 34b

núme-	gru-	código	WBC	N	L	E	Basófi-	Monóci-	LUC	Plt
ro	do	po/s	occn.	x10 ⁹ /L						
animal	o	exo					/L	9/L	9/L	/L
615	1M	PT	7,57	3,06	3,68	0,06	0,03	0,53	0,20	236
		D11	7,56	2,78	4,35	0,06	0,02	0,21	0,13	284
		TERM	7,93	3,77	3,52	0,06	0,02	0,49	0,07	254
465	2M	PT	14,19	1,78	10,37	1,24	0,05	0,55	0,20	302
		PTR	13,69	3,69	8,25	0,93	0,04	0,47	0,29	
		PD	13,36	1,55	9,95	1,01	0,04	0,58	0,25	325
		D11	12,26	4,70	5,63	1,27	0,04	0,51	0,11	403
		TERM	15,45	1,54	11,57	1,65	0,07	0,42	0,20	356
639	2M	PD	10,02	5,21	3,42	0,90	0,01	0,39	0,10	306
		D11	8,26	4,06	2,47	1,17	0,01	0,45	0,10	371
		TERM	8,70	2,55	4,20	1,04	0,02	0,80	0,09	253
613	3M	PT	20,21	12,99	6,45	0,02	0,04	0,50	0,21	438
		PTR	16,85	8,87	6,90	0,08	0,06	0,67	0,26	
		D11	10,85	6,11	4,15	0,03	0,02	0,41	0,12	411
		TERM	23,26	17,70	4,27	0,05	0,04	1,11	0,08	434

Tabela 34c

número do animal	grupo/sexo	código occn.	PT sec	APTT sec
615	1M	PT	11,3	37,3
		D11	10,3	32,7
		TERM	11,3	33,3
465	2M	PT	10,0	33,9
		PTR		
		PD	9,9	26,1
639	2M	D11	10,0	31,6
		TERM	10,2	29,4
		PD	10,6	22,6
613	3M	D11	10,5	26,3
		TERM	10,3	28,9
		PT	10,3	35,5
		PTR		
		D11	11,4	26,7
		TERM	10,3	30,8

Tabela 34d

número do animal	gru- po/sexo	código occn.	Aniso- citose	Micro- citose	Macro- citose	hipocro- masia	hipercro- masia
615	1M	PT	-	-	-	-	+
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	+
465	2M	PT	-	-	-	-	-
		PTR					
		PD	-	-	-	-	-
639	2M	D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
		PD	-	-	-	-	-
613	3M	D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
		PT	-	-	-	-	-
		PTR					
		D11	-	-	-	-	+
		TERM	-	-	-	-	-

Tabela 34e

número do animal	gru- po/s exo	código occn.	Hct L/L	Hb g/dL	RBC x10 ¹² /L	Retic %	MCH pg	MCH C	MCV g/dL
631	4M	PD	0,460	13,6	7,11	0,43	19,1	29,5	64,6
		D11	0,395	11,9	6,36	0,45	18,7	30,2	62,1
		TERM	0,449	13,7	6,97	0,30	19,6	30,5	64,4
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR							
		D11	0,404	13,1	6,33	0,57	20,6	32,3	63,8
652	1F	PT	0,390	11,3	5,72	1,15	19,8	29,1	68,2
		D11	0,374	11,9	5,55	1,06	21,4	31,7	67,4
		TERM	0,384	11,5	5,71	0,58	20,2	30,0	67,2
624	2F	PD	0,407	11,8	7,14	0,73	16,6	29,0	57,1
		D11	0,377	10,8	6,69	0,48	16,1	28,6	56,3
		TERM	0,401	11,7	6,99	1,07	16,7	29,1	57,4

Tabela 34f

núme- ro do animal	gru- po/se xo	código occn.	WBC x10 ⁹ / L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	Ba- sófilo x10- 9/L	Mo- nócito x10- 9/L	LUC x10 ⁹ /L	Plt x10 ⁹ /L
631	4M	PT	10,53	2,82	6,36	0,62	0,02	0,58	0,13	378
		D11	7,97	2,86	3,81	0,61	0,01	0,53	0,16	424
		TERM	8,08	1,73	5,04	0,63	0,02	0,60	0,05	384
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR	11,32	3,47	6,36	0,17	0,05	0,96	0,31	
		D11	9,70	4,74	3,73	0,09	0,02	0,84	0,28	429
652	1F	PT	10,66	3,21	6,05	0,42	0,03	0,80	0,15	373
		D11	12,01	5,53	5,20	0,34	0,02	0,78	0,13	380
		TERM	11,88	7,59	3,24	0,35	0,02	0,61	0,08	338
624	2F	PD	9,06	3,10	5,02	0,41	0,02	0,33	0,18	362
		D11	7,82	5,14	2,06	0,14	0,02	0,34	0,13	353
		TERM	11,69	4,33	5,46	0,96	0,02	0,76	0,16	426

Tabela 34g

número do animal	grupo/sexo	código occn.	PT sec	APTT sec
631	4M	PD	10,9	29,3
		D11	11,3	27,9
		TERM	10,8	32,1
614	1F	PT	CTD	CTD
		PTR		
		D11	10,2	32,1
652	1F	TERM	10,5	29,3
		PT	10,2	33,0
		D11	9,6	27,9
624	2F	TERM	10,3	30,3
		PD	10,6	27,1
		D11	10,6	29,7
		TERM	10,8	33,3

Tabela 34h

número do animal	gru- po/sexo	código occn.	Aniso- citose	Micro- citose	Macro- citose	hipo- croma- sia	hiper- croma- sia
631	4M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR					
		D11	-	-	-	-	-
652	1F	TERM	-	-	-	-	-
		PT	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
624	2F	TERM	-	-	-	-	-
		PD	-	+	-	-	-
		D11	-	+	-	-	-
		TERM	+	+	-	-	-

Tabela 34i

núme- ro animal	gru- do po/s exo	código occn.	Hct L/L	Hb g/dL	RBC x10 ¹² /L	Retic %	MC H pg	MCH C	MCV g/dL
632	3F	PT	0,416	12,4	6,36	0,83	19,6	29,9	65,4
		PTR	0,410	12,2	6,29	0,64	19,5	29,8	65,3
		D11	0,392	12,2	6,19	0,73	19,7	31,0	63,4
		TERM	0,412	12,3	6,46	0,55	19,1	29,9	63,8
640	4F	PT	0,398	11,8	5,81	0,95	20,3	29,7	68,5
		D11	0,369	11,0	5,30	1,17	20,7	29,8	69,6
		TERM	0,401	11,9	5,58	0,83	21,3	29,6	71,9

Tabela 34j

número do animal	gru- do ani- mal	código occn. exo	WBC x10 ⁹ /L	N x10 ⁹ /L	L x10 ⁹ /L	E x10 ⁹ /L	Basófi- lo x10- 9/L	Mo- nócito x10- 9/L	LU C x10 ⁹ /L	Plt
632	3F	PT	18,12	10,58	5,61	1,07	0,04	0,61	0,21	335
		PTR	15,16	5,99	7,24	0,95	0,03	0,63	0,31	308
		D11	10,23	4,69	4,15	0,66	0,01	0,48	0,23	348
		TERM	13,04	6,89	4,62	0,44	0,03	0,93	0,13	321
640	4F	PD	12,49	8,29	2,91	0,46	0,02	0,64	0,17	567
		D11	13,71	10,31	2,18	0,34	0,01	0,74	0,12	578
		TERM	11,49	5,41	4,18	0,63	0,03	1,12	0,12	555

Tabela 34k

número do animal	grupo/sexo	código occn.	PT sec	APTT sec
632	3F	PT	10,6	47,8
		PTR	10,6	44,7
		D11	10,2	33,1
		TERM	10,6	37,2
640	4F	PD	12,0	25,8
		D11	12,4	28,0
		TERM	12,8	30,1

Tabela 34I

núme- ro do animal	gru- po/sexo	código occn.	Aniso- citose	Micro- citose	Macro- citose	hipo- croma- sia	hiper- croma- sia
632	3F	PT	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
640	4F	PT	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Patologia Microscópica -- Descobertas relacionadas ao tratamento

[0324] A pericolangite (inflamação do tecido conjuntivo em torno do duto biliar) foi relatada no macaco fêmea dosado em 12 mg/kg/dia, mas não em quaisquer outros macacos fêmeas ou machos. Esta descoberta pode estar relacionada ao tratamento com Glyco-mAb (Anti-EGFR), mas com tais números pequenos de animais a importância é incerta. Todas as outras descobertas foram consideradas ser incidentais e de nenhuma importância toxicológica.

Macropatologia e Histopatologia

[0325] O sumário da histopatologia para todos os animais testados é apresentado na Tabela 35, abaixo:

Tabela 35

Histopatologia - distribuição do grupo e severidade das descobertas para todos os animais

Grupo	1	2	3				
Composto	-GLYCO-MAB (ANTI-EGFR)-						
Dosagem	1,5	4,5	12				
Número de Animais Afetados							
	Sexo	Macho	Fêmea				
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Órgão/Tecido Examinado	Número	1	1	1	1	1	1

Côlon	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
Coração	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
Rins	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
Infiltração Linfocítica Cortical	Mínimo	1	1	0	0	1	1
	Leve	0	0	0	1	0	[?]
	Total	1	1	0	1	1	1
Cefálico esquerdo	Nº Examinado	0	0	0	0	0	0
Safena esquerda	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Hiperplasia Epidérmica	Mínimo	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Fígado	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Focos de Célula Inflamatória	Mínimo	1	1	1	1	1	1
	Total	1	1	1	1	1	1
--Proliferação do Duto Biliar	Mínimo	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
--Vacuolização de Hepatócito	Mínimo	0	1	0	0	0	0
- Sulco Mediano	Total	0	1	0	0	0	0
--Pericolangite	Mínimo	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
Pulmões & Brônquios	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Brônquios/Bronquíolos	Leve	1	0	0	0	0	0
Células Inflamatórias Muco-sas/Submucosas							
	Total	1	0	0	0	0	0
--Macrófagos Alveolares	Mínimo	0	1	0	0	0	1
	Total	0	1	0	0	0	1
--Células Inflamatórias/Linfóides Perivasculares	Mínimo	0	0	1	0	0	1
	Total	0	0	1	0	0	1
--Agregados Linfóides	Mínimo	0	0	1	0	0	0
	Total	0	0	1	0	0	0
Esôfago	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1

--Agregados Linfóides	Mínimo	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Ovários	Nº Examinado	0	0	0	1	1	1
--Cisto Folicular(S)	Presente	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
--Corpo Lúteo Proeminente	Presente	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Pâncreas	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Atrofia Acinar	Mínimo	0	0	1	1	0	1
	Total	0	0	1	1	0	1
--Agregados Linfóides	Mínimo	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Cefálico Direito	Nº Examinado	0	0	0	0	0	0
Safena direita	Nº Examinado	0	0	0	0	0	0
Pele (Protocolo)	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Hiperplasia Epidérmica	Mínimo	0	0	0	0	0	1
	Moderado	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	1
Medula Espinal	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Hemorragia	Mínimo	0	0	1	1	1	1
	Leve	0	1	0	0	0	0
	Total	0	1	1	1	1	1
Baço	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
Esterno & Medula	Nº Examinado	0	0	0	0	0	0
Estômago	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
Testes	Nº Examinado	1	1	1	0	0	0
--Imaturidade	Presente	1	1	1	0	0	0
	Total	1	1	1	0	0	0
Timo	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
--Cisto(S)	Presente	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0

--Involução/Atrofia	Mínimo	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0.
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Bexiga Urinária	Nº Examinado	1	1	1	1	1	1
Colo Uterino	Nº Examinado	0	0	0	1	1	1
--Mucificação Epitelial	Presente	0	0	0	1	1	1
	Total	0	0	0	1	1	1
Útero	Nº Examinado	0	0	0	1	1	1
--Congestão	Mínimo	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Ceco	Nº Examinado	1	0	0	1	0	0
--Tecido Adiposo Submucoso Prominente	Mínimo	1	0	0	1	0	0
	Total	1	0	0	1	0	0
Trompa de Falópio	Nº Examinado	0	0	0	1	1	1
Ln Mesentérico	Nº Examinado	0	0	0	1	0	0
--Macrófagos Pigmentados Aumentados	Leve	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0

Descobertas Individuais para Todos os Animais

[0326] As observações patológicas para animais individuais são apresentadas na Tabela 36, abaixo:

Tabela 36

Macropatologia e histopatologia - descobertas individuais para todos os animais

Grupo	1	2	3
Composto	-GLYCO-MAB (ANTI-EGFR)-		
Dosagem	1,5	4,5	12

Observações Patológicas

Sexo	Macho	Grupo de Dose	1
Animal Nº	0623	Semana de estudo	11

		do sacrifício	
Peso corporal terminal	2715,0 gramas	Dia de estudo do sacrifício	77
NECRÓPSIA		HISTOPATOLOGIA	
Ceco:		Ceco:	
-Área Elevada(S); Aspecto Mucoso, Múltiplo, até 3 mm.		-Tecido Adiposo Submucoso Proeminente, - Mínimo, Focal	
Côlon:		Côlon:	
-Área Elevada(S); Aspecto Mucoso, Múltiplo, até 2 mm.		Nenhuma Lesão Significante	
		Rins:	
		-Infiltração Linfocítica Cortical, - Míni- mo	
Fígado:		Fígado:	
-Área Clara do Sulco Mediano(S); Uma, Subcapsular, 3 mm.		-Focos de Célula Inflamatória, - Míni- mo	
		Pulmões & Brônquios:	
		-Brônquios/Bronquíolos Células Inflamatórias Muco- sas/Submucosas, -Leve	
Estômago:		Estômago:	
-Área Elevada do Corpo(S); Mucosa, Uma, Próxima ao Antro, 3 mm.		>Nenhuma Lesão Significante	
		Testes:	
		-Imaturidade, -Presente	
Sexo	Macho	Grupo de Dose	2
Animal Nº	0461	Semana de estudo do sacrifício	18
Peso corporal terminal	2573,0 gramas	Dia de estudo do sacrifício	125
NECRÓPSIA		HISTOPATOLOGIA	

	Rins
	-Infiltração Linfocítica Cortical, -Mínimo
Fígado:	Fígado
-Área Clara do Sulco Mediano(S); Uma, Subcapsular, 4 mm.	-Focos de Célula Inflamatória, - Mínimo -Vacuolização de Hepatócito - Sulco Mediano, -Mínimo
Pulmões & Brônquios:	Pulmões & Brônquios:
-Colapso Incompleto; Lóbulos Direitos.	-Macrófagos Alveolares, -Mínimo
	Medula Espinhal:
	-Hemorragia, -Leve, Multifocal
	Testes:
	-Imaturidade, -Presente
Sexo	Macho
Animal Nº	0463
Peso corporal terminal	2919,0 gramas
NECRÓPSIA	HISTOPATOLOGIA
	Fígado: -Focos de Célula Inflamatória, - Mínimo
	Pulmões & Brônquios: - Células Inflamatórias/Linfóides Perivasculares, -Mínimo -Agregados Linfóides, -Mínimo, Focal
	Pâncreas: -Atrofia Acinar, -Mínimo, Focal
	Medula Espinhal:

		-Hemorragia, -Mínimo	
		Testes:	
		-Imaturidade, -Presente	
Animal não tem nenhuma observação bruta registrada			
Sexo	Fêmea	Grupo de Dose	1
Animal Nº	0590	Semana de estudo do sacrifício	11
Peso corporal ter- minal	3176,0 gramas	Dia de estudo do sacrifício	77
NECRÓPSIA		HISTOPATOLOGIA	
Ceco:		Ceco:	
-Área Elevada(S); Aspecto Mucoso, Múltiplo, até 2 mm.		-Tecido Adiposo Submucoso Proemi- nente, -Mínimo, Multifocal	
Côlon:		Côlon:	
-Área Elevada(S); Aspecto Mucoso, Múltiplo, até 2 mm.		>Nenhuma Lesão Significante	
		Rins:	
		-Infiltração Linfocítica Cortical, -Leve, Focal	
		Safena esquerda:	
		-Hiperplasia Epidérmica, -Mínimo	
Fígado:		Fígado:	
-Área Clara do Sulco Mediano(S); Uma, Subcapsular, 3 mm.		-Focos de Célula Inflamatória, - Mínimo	
Ln Mesentérico:		Ln Mesentérico:	
-Congestionado, Mínimo		-Macrófagos Pigmentados Aumenta- dos, - Leve	
Ovários:		Ovários:	
-Cisto(S); Esquerdo, Um, Cheio de Fluido Claro, 4 mm.		-Cisto Folicular(S), -Presente	
		Pâncreas:	
		-Atrofia Acinar, -Mínimo	

	-Agregados Linfóides, -Mínimo
	Pele (Protocolo):
	-Hiperplasia Epidérmica, -Moderado
	Medula Espinal:
	-Hemorragia, -Mínimo
Baço:	Baço:
-Cápsula Espessa; Área, Difusa.	>Nenhuma Lesão Significante
	Colo Uterino:
	-Mucificação Epitelial, -Presente
Sexo	Fêmea
Animal Nº	0462
Peso corporal terminal	2910,0 gramas
NECRÓPSIA	HISTOPATOLOGIA
	Rins:
	-Infiltração Linfocítica Cortical, - Mínimo, Focal
	Fígado:
	-Focos de Célula Inflamatória, - Mínimo
Pulmões & Brônquios:	Pulmões & Brônquios:
-Colapso Incompleto; Lóbulos Esquerdos.	Nenhuma Lesão Significante
Ovários:	Ovários:
-Área Elevada(S); Uma em Cada, Esquerdo, 3 mm; Direito, 2 mm. (Folículos)	-Corpo Lúteo Proeminente, -Presente
	Medula Espinal:
	-Hemorragia, -Mínimo
Timo:	Timo:
-Pequeno; 1,066 g.	-Cisto(S), -Presente

	-Involução/Aтрофия, -Mínimo
	Colo Uterino:
	-Mucificação Epitelial, -Presente
Útero:	Útero:
-Congestionado, Mínimo	-Congestão, -Mínimo
Sexo	Fêmea
Animal Nº	0612
Peso corporal terminal	2934,0 gramas
	Grupo de Dose
	18
	Semana de estudo do sacrifício
	Dia de estudo do sacrifício
	125
NECRÓPSIA	HISTOPATOLOGIA
	Rins:
	-Infiltração Linfocítica Cortical, -Mínimo, Focal
Fígado:	Fígado:
-Área Clara do Sulco Mediano(S); Uma, Subcapsular, 3 mm.	-Focos de Célula Inflamatória, -Mínimo
-Cisto(S); Dentro do Sulco, Um, Fluido Escuro - Cheio, Verde, 2 mm.	-Proliferação do Duto Biliar, -Mínimo -Pericolangite, -Mínimo
Pulmões & Brônquios:	Pulmões & Brônquios:
-Colapso Incompleto; Lóbulos Esquerdos.	-Macrófagos Alveolares, -Mínimo
	-Celulas Inflamatórias/Linfoides Perivasculares, -Mínimo
	Esôfago:
	-Agregados Linfoides, -Mínimo
	Pâncreas:
	-Atrofia Acinar, -Mínimo, Focal
	Pele (Protocolo):
	-Hiperplasia Epidérmica, -Mínimo
	Medula Espinhal:

	-Hemorragia, -Mínimo
	Colo Uterino:
	-Mucificação Epitelial, -Presente

[0327] Os pesos corporais individuais dos macacos-carangueeiros são apresentados na Tabela 37, abaixo:

Tabela 37: Pesos corporais: Valores Individuais (1^a parte)

Animal Nº	peso corporal (kg) no dia									
	-17	-9	1*	8*	15*	22*	29	36		
Grupo 1: GA201-ge, 1,5 mg/kg/ocasião										
623m	2,67	2,65 (-0,02)	2,69 (+0,04)	2,72 (+0,03)	2,76 (+0,04)	2,62 (-0,14)	2,72 (+0,10)	2,65 (0,07)	2,71 (+0,06)	
590f	2,98	2,92 (-0,06)	2,97 (+0,05)	3,14 (+0,17)	3,13 (-0,01)	3,01 (-0,12)	3,06 (+0,05)	3,00 (-0,06)	3,19 (+0,19)	
Grupo 2: GA201-ge, 4,5 mg/kg/ocasião										
461m	2,50	2,56 (+0,06)	2,53 (-0,03)	2,47 (-0,06)	2,53 (+0,06)	2,53 NC	2,53 NC	2,61 (+0,08)	2,53 (-0,08)	
462f	2,87	2,96 (+0,09)	2,91 (-0,05)	2,82 (-0,09)	2,95 (+0,13)	2,89 (-0,06)	2,88 (-0,01)	2,79 (-0,09)	2,91 (+0,12)	
Grupo 3: GA201-ge, 12 mg/kg/ocasião										
463m	2,69	2,81 (+0,12)	2,86 (+0,05)	2,74 (-0,12)	2,81 (+0,07)	2,81 NC	2,81 NC	2,81 NC	2,75 (-0,06)	
612f	2,84	2,96 (+0,12)	2,92 (-0,04)	2,98 (+0,06)	3,06 (+0,08)	3,01 NC	3,01 NC	2,94 (-0,07)	2,91 (-0,03)	

Tabela 37: (2^a parte)

Animal Nº	peso corporal (kg) no dia						mudança de peso (kg)	D1 a 71	D29 a 71
	50	57	64	71	77				
Grupo 1: GA201-ge, 1,5 mg/kg/ocasião									
623m	2,73 (0,02)	2,61 (-0,12)	2,74 (+0,13)	2,71 (-0,03)	2,75 (+0,04)	+0,06	+0,03		
590f	3,16 (-0,03)	3,11 (-0,05)	3,18 (+0,07)	3,27 (+0,09)	3,23 (-0,04)	+0,27	+0,17		
Grupo 2: GA201-ge, 4,5 mg/kg/ocasião									

Animal Nº	peso corporal (kg) no dia						mudança de peso (kg)	D 1 a 71	D 29 a 71
	50	57	64	71	77				
461m	2,45 (0,08)	2,54 (+0,09)	2,60 (+0,06)	2,59 (-0,01)			+0,03	+0,06	
462f	2,95 (+0,04)	3,05 (+0,10)	3,02 (-0,03)	2,96 (-0,06)			+0,05	+0,08	
Grupo 3: GA201-ge, 12 mg/kg/ocasião									
463m	2,71 (-0,04)	2,92 (+0,21)	2,98 (+0,06)	3,09 (+0,11)			+0,23	+0,28	
612f	2,81 (-0,10)	3,04 (+0,23)	3,05 (+0,01)	3,10 (0,05)			+0,18	+0,09	

Conclusões

[0328] Não houve nenhum efeito do tratamento nos sítios de injeção e nenhuma descoberta clínica considerada estar relacionada ao tratamento com Glyco-mAb (anti-EGFR). As mudanças no peso corporal estavam dentro das faixas esperadas normais. Não houve nenhuma descoberta considerada estar relacionada ao tratamento no exame macroscópico e os pesos dos órgãos dos animais estavam dentro de faixas esperadas normais. Em conclusão, o tratamento em 1,5, 4,5 ou 12 mg/kg/ocasião foi bem tolerado sem nenhuma descoberta clara de toxicidade sistêmica.

[0329] EGFR não é um alvo específico do tumor, visto que ele está presente na superfície de várias tecidos normais incluindo fígado, rim e pele. Os anticorpos anti-EGFR com região Fc de IgG1 humana foram previamente administrados aos seres humanos e mostraram um perfil de efeito colateral tolerável (Vanhoefer, U. et al., *Clin. Oncol.* 1 de Jan de 2004; 22(1):175-84; Needle MN, *Semin Oncol.* Out. de 2002; 29 (5 Suppl 14): 55-60). Claramente, haveria interesses significantes para administrar a um ser humano ou outro mamífero um anticorpo anti-EGFR com ADCC significantemente aumentada, devido à atividade de

matança realçada que pode ser exibida contra tecidos normais críticos tais como fígado, rim e pele. Surpreendentemente, os presentes inventores descobriram que administrando um tal anticorpo anti-EGFR, engendrado em Fc como descrito acima e com atividade de ADCC aumentada até 1000 vezes, *in vivo* para mamíferos não levou a toxicidades significantes. As concentrações de anticorpo foram mantidas acima de 1 micrograma por mililitro durante pelo menos 4 semanas (e acima de 100 microgramas por mililitro para alguns animais). Tais níveis de exposição são típicos para a terapia de anticorpo. A ADCC máxima para o anticorpo deste estudo já foi obtida em concentrações de 1 micrograma por mililitro. As administrações de dose única de doses de 40 e 100 mg de anticorpo anti-EGFR (o anticorpo ICR62 de rato parental) a pacientes humanos com câncer mostraram alvejamento específico de tumores *in vivo* (Modjtahedi, H. et al., *Br J Cancer*. Jan de 1996;73(2):228-35.). As células efetoras de macaco-caranguejeiro têm receptor FcgamaRIII altamente homólogo e mostraram mediar ADCC realçada com anticorpos engendrados em Fc (e com anticorpos glicoengendrados para níveis aumentados de oligossacarídeos não fucosilados na região Fc). O nível de aumento de ADCC é muito similar àquele observado com células efetoras humanas (PBMCs).

[0330] Em resumo, descobriu-se que anticorpos anti-EGFR engendrados em Fc para afinidade de ligação de Fc-FcgamaRIII aumentada e para ADCC aumentada podem ser administrados aos mamíferos para fornecer concentrações acima de 1 micrograma de anticorpo por mililitro de soro durante um período de pelo menos 4 semanas de modo a fornecer exposições a fármaco normalmente associadas com acúmulo significante de anticorpo em células alvo *in vivo*, sem levar à toxicidade significante.

[0331] A toxicidade de uma molécula de ligação de antígeno da presente invenção pode ser medida e/ou determinada usando qual-

quer um dos métodos e/ou parâmetros (por exemplo valores da química sanguínea, indicadores histopatológicos, etc.) descritos aqui acima, ou por quaisquer meios conhecidos daqueles versados na técnica. Um nível clinicamente significante de toxicidade é entendido por uma pessoa versada na técnica ser um nível que excede níveis geralmente aceitos pela U.S. Food and Drug Administration para anticorpos clinicamente administrados.

Exemplo 5

Modificações às CDRs de Cadeia Leve

[0332] Usando os métodos descritos acima, variantes da região variável de cadeia leve anti-EGFR foram geradas a partir do constructo da região variável de cadeia leve I-KC (SEQ ID NO: 43 e SEQ ID NO: 45), em que a sequência que codifica o resíduo de aminoácido em várias posições nas CDRs de ICR62 de rato foram substituídas com o resíduo de aminoácido correspondente de uma sequência genética variável de linha germinativa humana. A Tabela 38 mostra as substituições que foram feitas dentro das CDRs do constructo da região variável de cadeia leve I-KC (SEQ ID NO: 45):

Tabela 38: CDRs de Cadeia Leve Minimizadas

nome do constructo	substituição de aminoácido feita na SEQ ID NO: 45	CDR de cadeia leve na qual a substituição foi feita
I-KC1	N30R*	CDR1
I-KC2	Y32W	CDR1
I-KC3	N34G	CDR1
I-KC4	N50T	CDR2
I-KC5	T51A	CDR2
I-KC6	N52S	CDR2
I-KC7	N53S	CDR2
I-KC8	T56S	CDR2
I-KC9	F94Y	CDR3

* Identificada de acordo com a nomenclatura padrão (por exemplo, "N30R" significa que o resíduo de Asparagina (N) na posição 30 da SEQ ID NO: 45 é substituído com um resíduo de arginina (R)).

[0333] Todos os resíduos de substituição identificados acima foram derivados da sequência aceitante de VK1_6 humana exceto para a troca de Y32W, em que o W de uma sequência de linha germinativa humana relacionada foi substituída no lugar de Y na posição 32 na SEQ ID NO: 45.

[0334] Cada uma dos constructos variantes de I-KC (I-KC1 a I-KC9) foi emparelhado com uma região variável de cadeia pesada compreendendo o constructo I-HHD (SEQ ID NO: 16 e SEQ ID NO: 15) e um ensaio de ligação realizado de acordo com os métodos descritos nos exemplos anteriores. Os constructos I-KC1 a I-KC9 foram comparados ao constructo I-KC (SEQ ID NO: 46 e SEQ ID NO: 45) quanto à afinidade de ligação a EGFR em células alvo A431 (figura 29). Como observado na figura 29, apenas a modificação do resíduo 34 à sua sequência humana correspondente (N34G) resultou em uma diminuição leve na afinidade de ligação (valor de EC₅₀ aumentado por um fator de 10). Todas as outras constructos reteram atividade de ligação comparável ao constructo I-KC (SEQ ID NO: 45). Portanto, quando emparelhada com um constructo de cadeia pesada químérica (por exemplo, humanizada) específica para EGFR, a cadeia leve pode ser inteiramente humana (por exemplo, de uma sequência genética V de cadeia leve humana) e ainda retêm ligação específica para EGFR. Em particular, CDR2 e CDR3 podem estar inteiramente na forma de linha germinativa humana.

Moléculas de Ligação de Antígeno Compreendendo CDRs específicas de EGFR

[0335] A presente invenção portanto considera uma molécula de ligação de antígeno compreendendo uma região variável de cadeia

pesada quimérica (por exemplo, humanizada) compreendendo CDRs específicas de EGFR emparelhadas com uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve tem menos do que dez resíduos de aminoácido não humanos. Em outras modalidades, a região variável de cadeia leve tem menos do que nove, oito, sete, seis, cinco, quatro, três, dois, ou um resíduo(s) de aminoácido não humano. Em modalidades preferidas, a região variável de cadeia leve tem menos do que dois ou menos do que um (isto é, nenhum) resíduos de aminoácido não humanos. Em uma modalidade, a região variável de cadeia leve compreende uma ou mais sequências genéticas de região variável de linha germinativa humana. As sequências genéticas de região variável de linha germinativa humana que codificam regiões variáveis de cadeia leve são conhecidas na técnica, e podem ser encontradas, por exemplo, na base de dados de IMGT, disponível em <http://imgt.cines.fr/home.html>. Em uma modalidade preferida, a sequência de linha germinativa humana é derivada da sequência de linha germinativa VK1_6. Em outras modalidades, os resíduos de aminoácido dentro da sequência de aminoácido da região variável de cadeia leve de linha germinativa humana podem ser substituídos com um ou mais resíduos de uma outra sequência da região variável de cadeia leve de linha germinativa humana.

[0336] Em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 1; SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 17; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 21; SEQ ID No: 23; SEQ ID No: 25; SEQ ID No: 27; SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; e SEQ ID No: 121, e uma cadeia leve compreen-

dendo um polipeptídeo codificado por uma ou mais sequências genéticas variáveis de linha germinativa humana. Em uma modalidade preferida, a sequência de linha germinativa humana é derivada da sequência de linha germinativa VK1_6.

[0337] Em uma outra modalidade, a presente invenção é direcionada a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 122, e SEQ ID NO: 124; (b) uma sequência selecionada de um grupo consistindo em: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, e SEQ ID NO: 126; (c) SEQ ID NO: 108; e (d) um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia leve humana codificada por uma ou mais sequências genéticas de linha germinativa humana. Em uma modalidade particular, a sequência de linha germinativa humana é derivada da sequência de linha germinativa VK1_6. Em uma outra modalidade, a sequência genética de região variável de linha germinativa humana compreende a sequência genética de linha germinativa VK1_6 com uma substituição de um ou mais códons de aminoácido com uma sequência de uma sequência genética de região variável de cadeia leve de linha germinativa humana diferente.

[0338] Em outras modalidades, a molécula de ligação de antígeno da presente invenção compreende uma região variável de cadeia pesada específica de EGFR da presente invenção, e uma variante da SEQ ID NO: 45. Em uma modalidade, a variante da SEQ ID NO:

45 compreende uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições nas regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Em modalidades específicas, a substituição é de um resíduo de aminoácido em uma posição selecionada do grupo consistindo em: posição de aminoácido 30 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 32 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 34 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 50 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 51 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 52 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 53 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 56 da SEQ ID NO: 45; posição de aminoácido 94 da SEQ ID NO: 45; e qualquer combinação de substituições destes. Em modalidades mais específicas, a substituição na SEQ ID NO: 45 é selecionada do grupo consistindo em: substituição de uma arginina (R) no lugar da asparagina (N) na posição 30 da SEQ ID NO: 45; substituição de um triptofano (W) no lugar da tirosina (Y) na posição 32 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma glicina (G) no lugar da asparagina (N) na posição 34 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma treonina (T) no lugar da asparagina (N) na posição 50 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma alanina (A) no lugar da treonina (T) na posição 51 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma serina (S) no lugar da asparagina (N) na posição 52 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma serina (S) no lugar da asparagina (N) na posição 53 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma serina (S) no lugar da treonina (T) na posição 56 da SEQ ID NO: 45; substituição de uma tirosina (Y) no lugar da fenilalanina (F) na posição 94 da SEQ ID NO: 45; e qualquer combinação destes. Em uma modalidade particular, todas estas substituições de resíduos de aminoácido na SEQ ID NO: 45 são incorporadas em uma única variante de cadeia leve. Em modalidades preferidas, as moléculas de ligação de antígeno compreendendo as variantes de cadeia leve com substituições de aminoácido

para as CDRs de ICR62 retêm a ligação específica a EGFR (quando comparado a uma molécula de ligação de antígeno compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 45) quando a variante de cadeia leve é emparelhada com um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia pesada da presente invenção.

[0339] A presente invenção também é direcionada aos polinucleotídeos que codificam qualquer um dos polipeptídeos e/ou moléculas de ligação de antígeno acima. A presente invenção é direcionada ainda às moléculas de ligação de antígeno descritas acima, com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0340] Todas as publicações tais como compêndios, artigos de jornal, GenBank ou outras entradas de base de dados de sequência, pedidos de patente publicados, e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência à mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individuais fossem específica e individualmente indicados para serem incorporados por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação ao antígeno anti-EGFR humanizada, caracterizada pelo fato de que se liga especificamente a EGFR, em que a referida molécula de ligação ao antígeno comprehende um primeiro polipeptídeo, um segundo polipeptídeo e uma região Fc humana, em que pelo menos 70% dos oligossacarídeos na referida região Fc são não fucolisados,

em que o referido primeiro polipeptídeo comprehende uma sequência de:

- (a) a CDR1 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 53; e
- (b) a CDR2 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 79; e
- (c) a CDR3 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 107; e
- (d) uma região constante de cadeia pesada de IgG1 humana; e

em que o referido segundo polipeptídeo comprehende uma sequência de:

- (e) a CDR1 da cadeia leve da SEQ ID NO: 111 ou SEQ ID NO: 113; e
- (f) a CDR2 da cadeia leve da SEQ ID NO: 115; e
- (g) a CDR3 da cadeia leve da SEQ ID NO: 117; e
- (h) uma região constante kappa de cadeia leve humana.

2. Molécula de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro polipeptídeo comprehende uma sequência de:

- (a) a CDR1 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 53; e
 - (b) a CDR2 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 79; e
 - (c) a CDR3 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 107; e
- em que o referido segundo polipeptídeo comprehende uma sequência de:
- (d) a CDR1 da cadeia leve da SEQ ID NO: 113; e

(e) a CDR2 da cadeia leve da SEQ ID NO: 115; e

(f) a CDR3 da cadeia leve da SEQ ID NO: 117.

3. Molécula de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de ligação ao antígeno comprehende um primeiro polipeptídeo comprehendendo a sequência da SEQ ID NO: 15 e um segundo polipeptídeo comprehende a sequência da SEQ ID NO: 45.

4. Molécula de ligação ao antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de ligação ao antígeno é um anticorpo humanizado.

5. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que comprehende a molécula de ligação ao antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

6. Método para detectar a presença de EGFR em uma amostra, caracterizado pelo fato de que comprehende usar a molécula de ligação ao antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, para contatar uma amostra a ser testada, opcionalmente com uma amostra controle, sob condições que permitam a formação de um complexo entre a referida molécula de ligação ao antígeno e EGFR; e em que a presença de EGFR é indicada pela detecção dos complexos de molécula de ligação ao antígeno-EGFR.

7. Uso da molécula de ligação ao antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um medicamento para o tratamento de uma doença relacionada a EGFR.

8. Uso da molécula de ligação ao antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um medicamento para o tratamento ou diagnose de uma doença definida pela superexpressão de EGFR.

9. Uso da molécula de ligação ao antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um medicamento para o tratamento de uma doença de proliferação celular tratável através do bloqueio da sinalização mediada por EGFR.

10. Uso da molécula de ligação ao antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de câncer.

11. Uso da molécula de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em: câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer de pâncreas, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de cólon, câncer de próstata, câncer de rim e câncer cerebral.

1/29

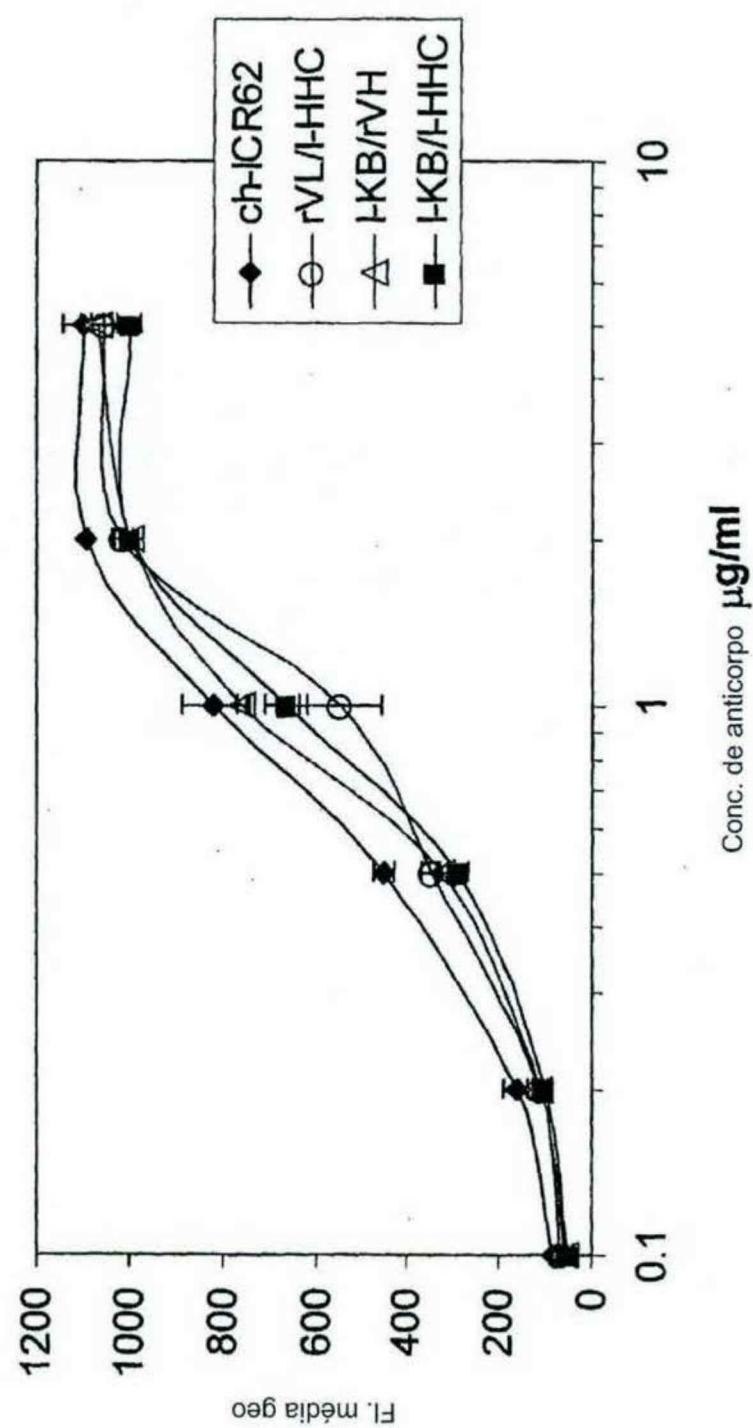


Fig. 1

2/29

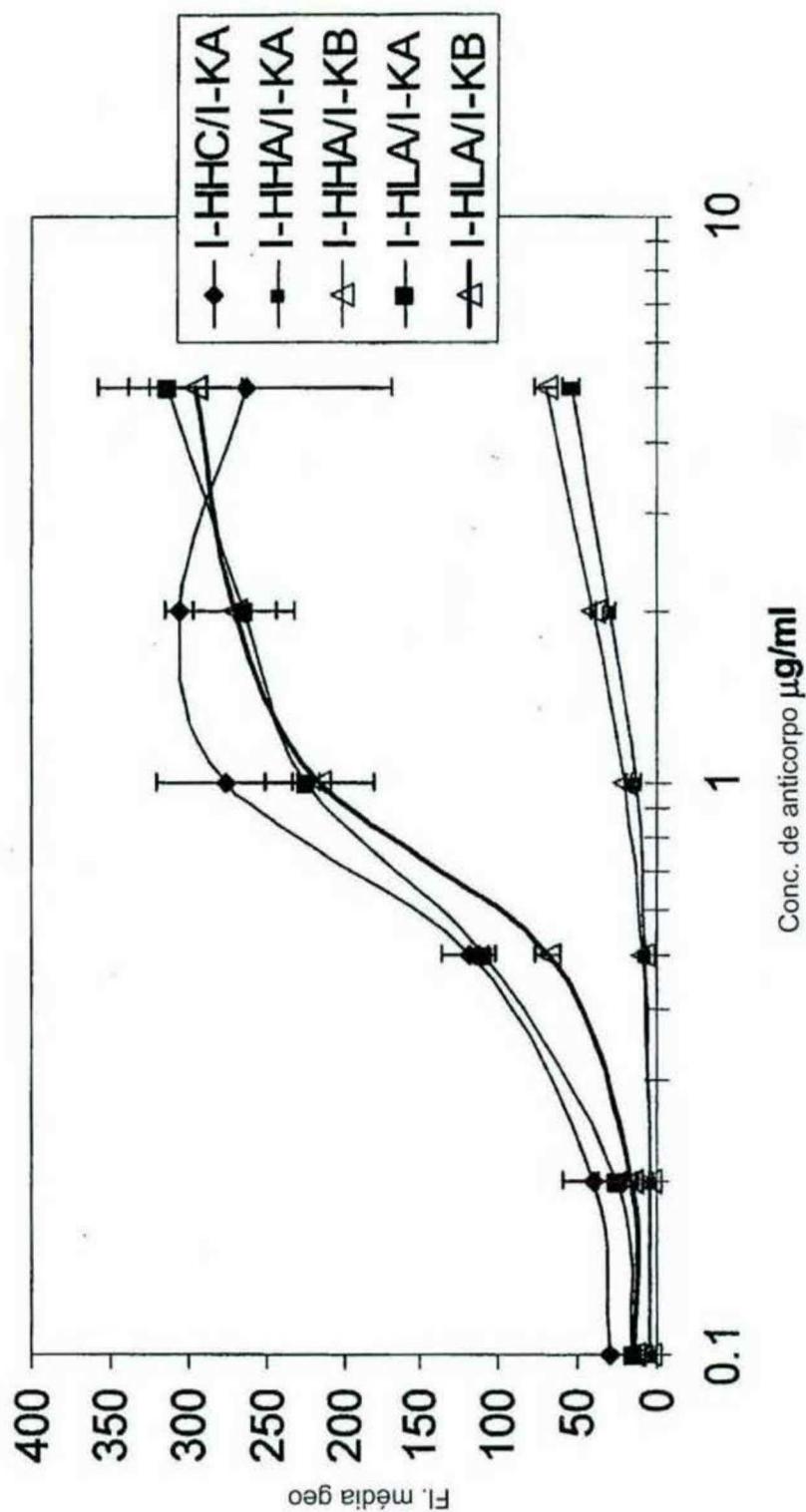


Fig. 2

3/29

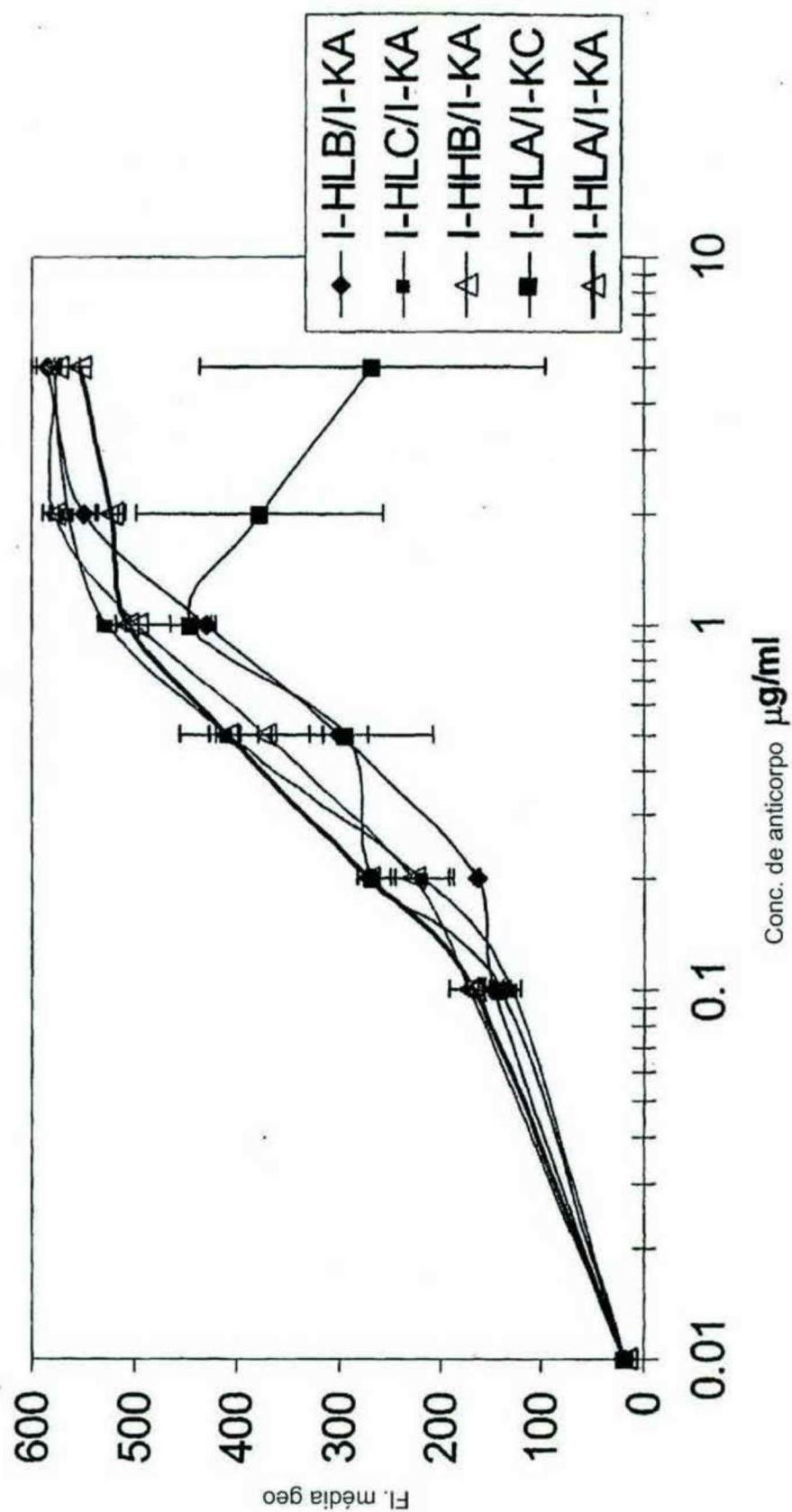


Fig. 3

4/29

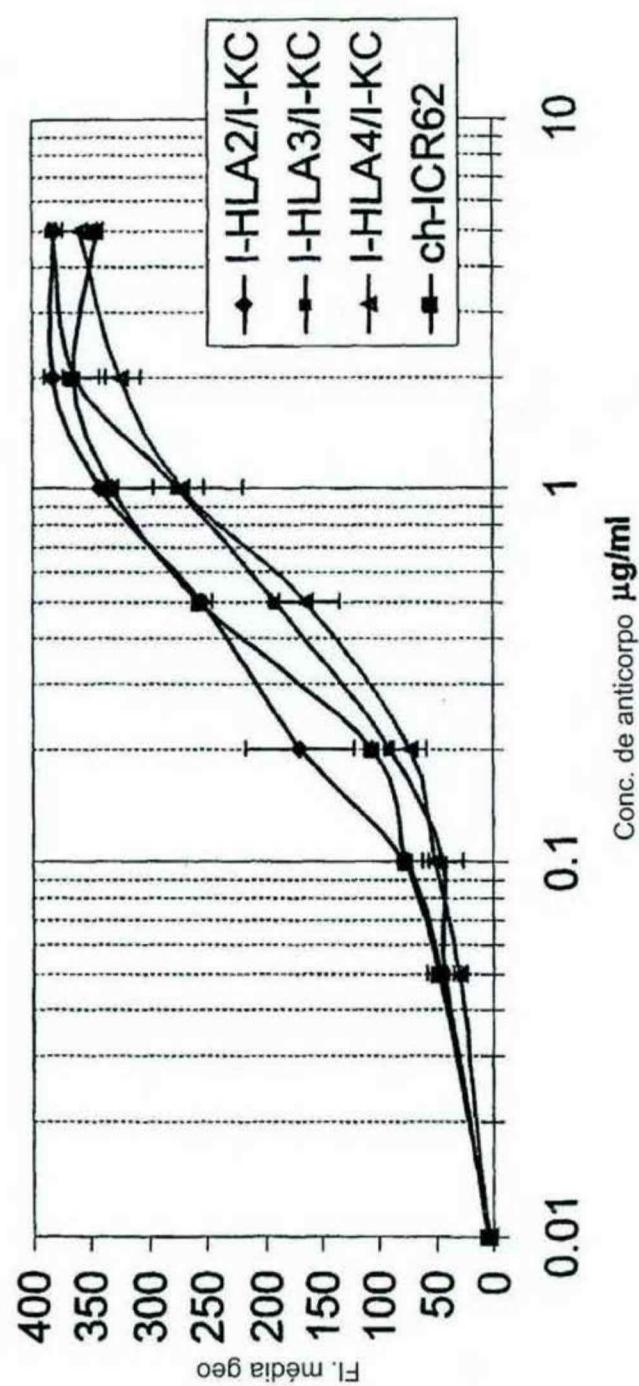


Fig. 4

5/29

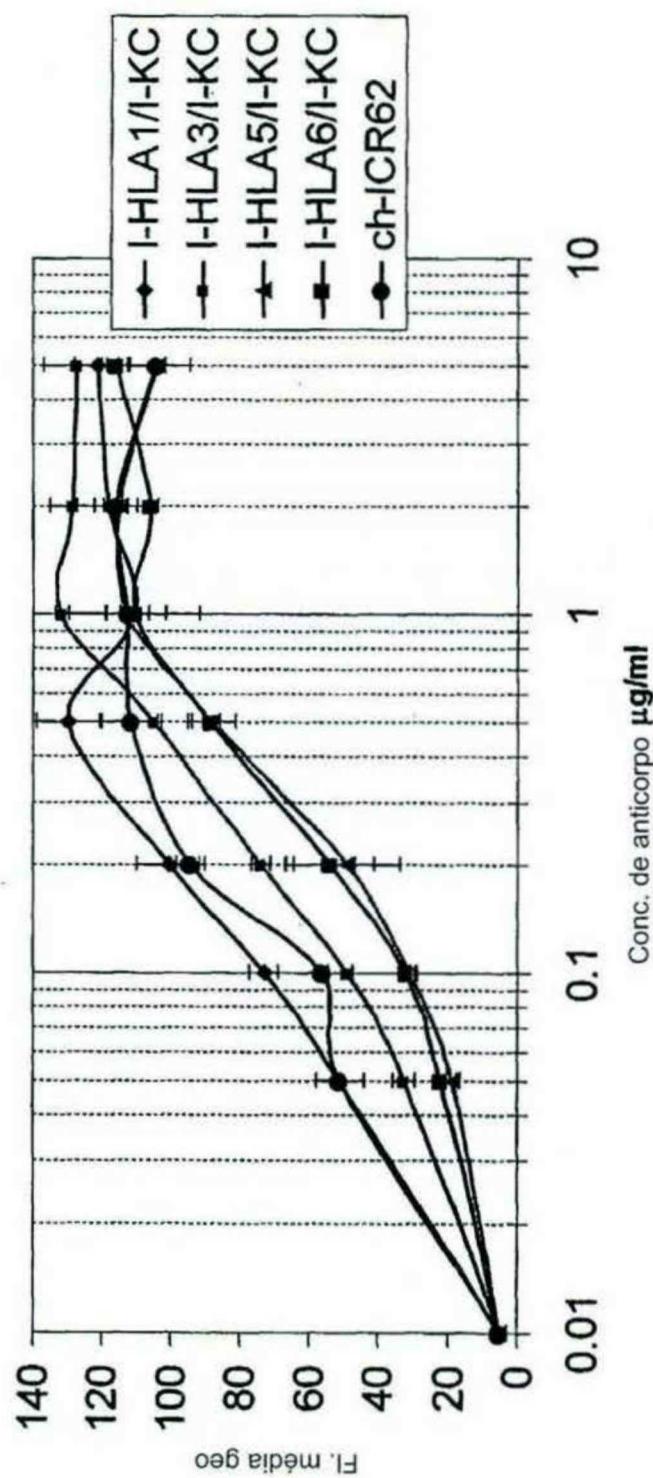


Fig. 5

6/29

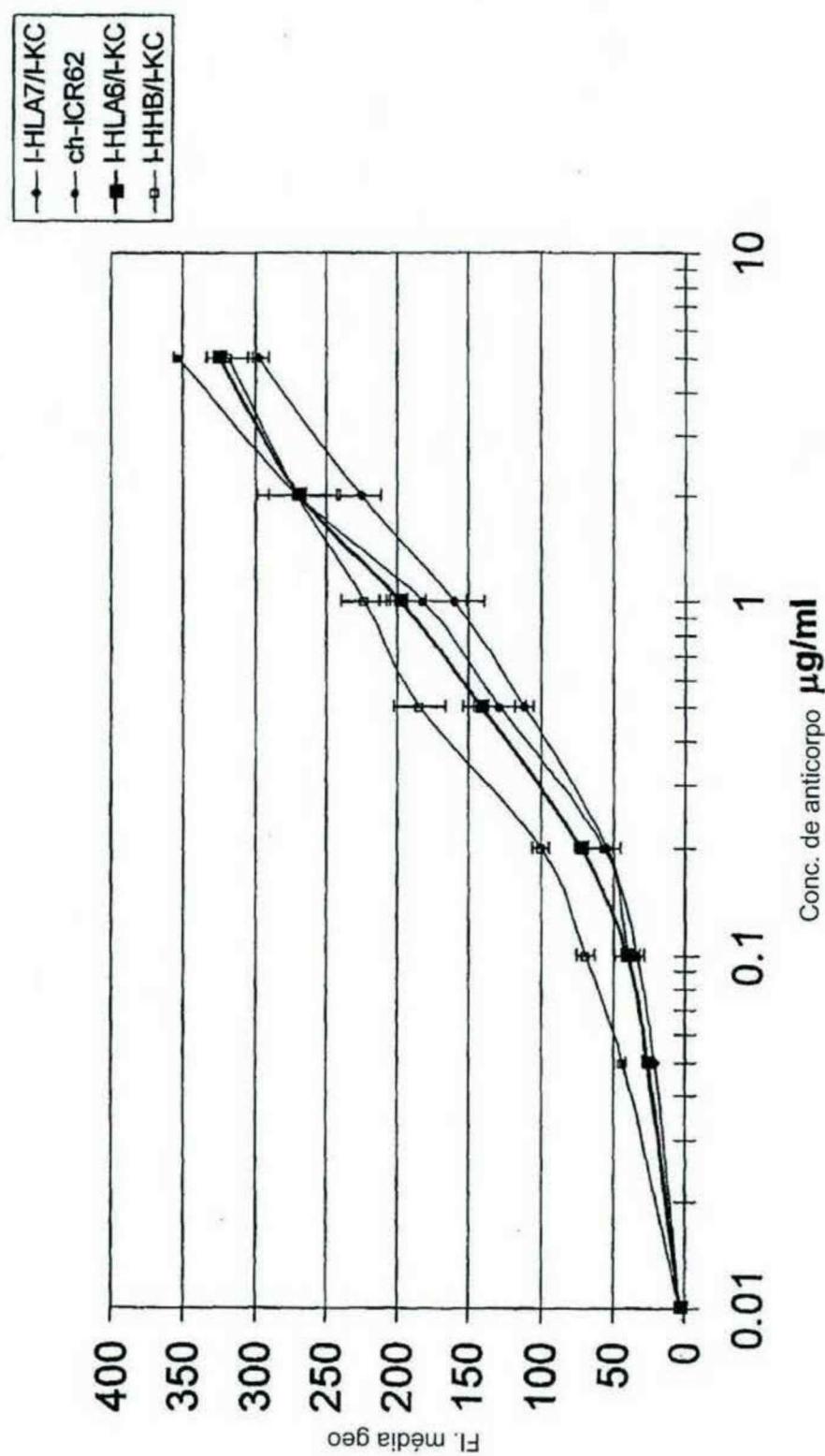


Fig. 6

7/29

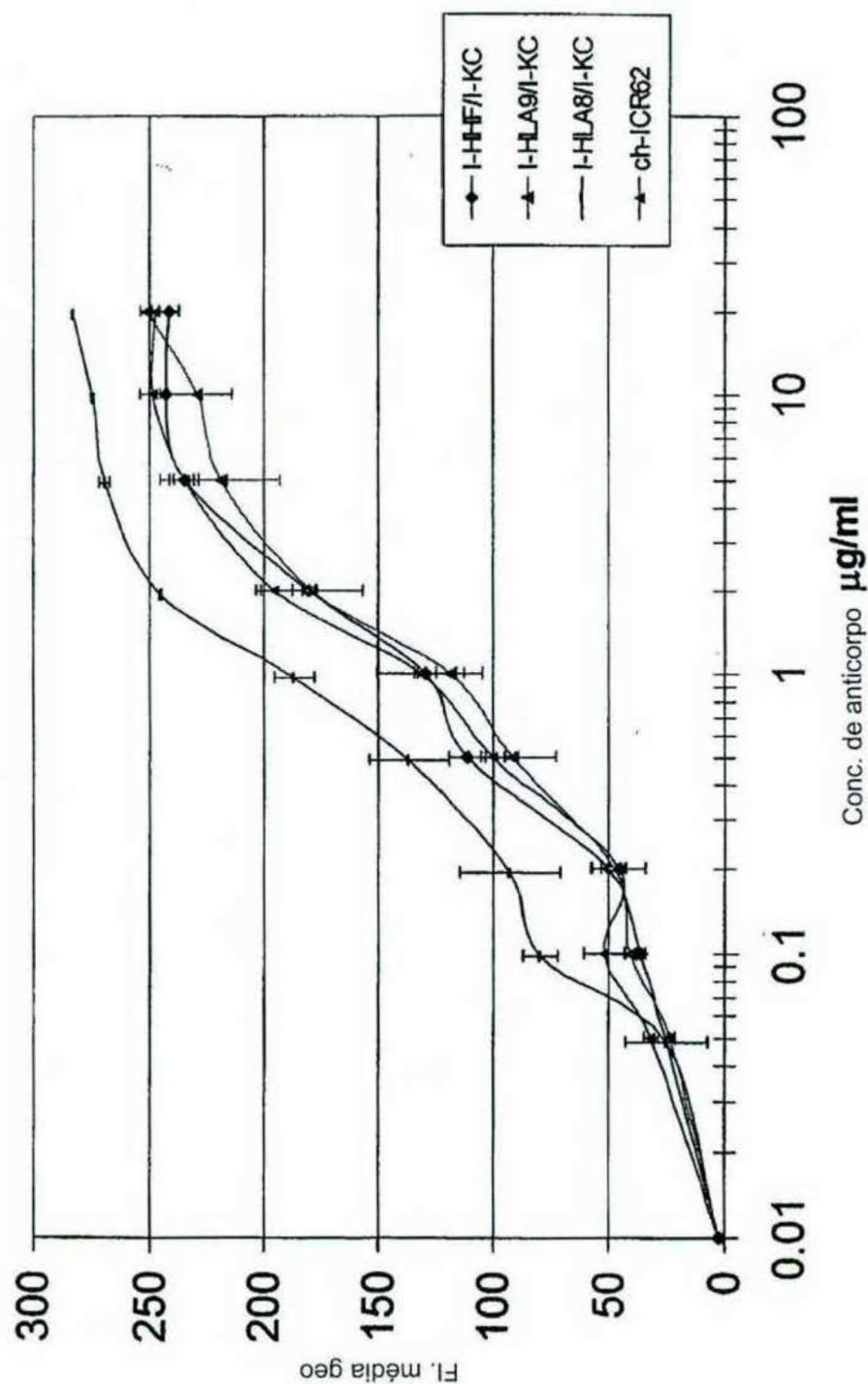


Fig. 7

8/29

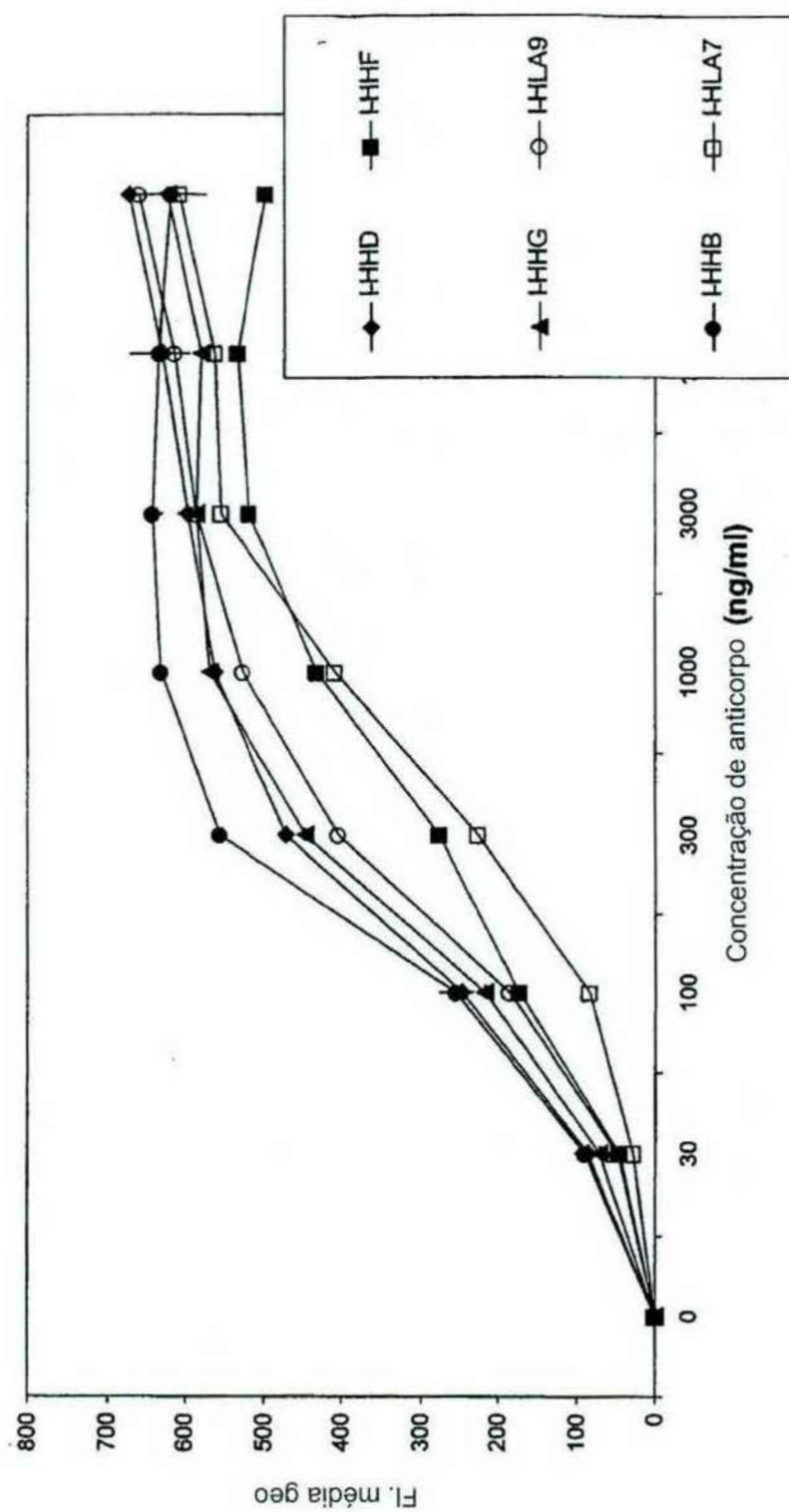


Fig. 8

9/29

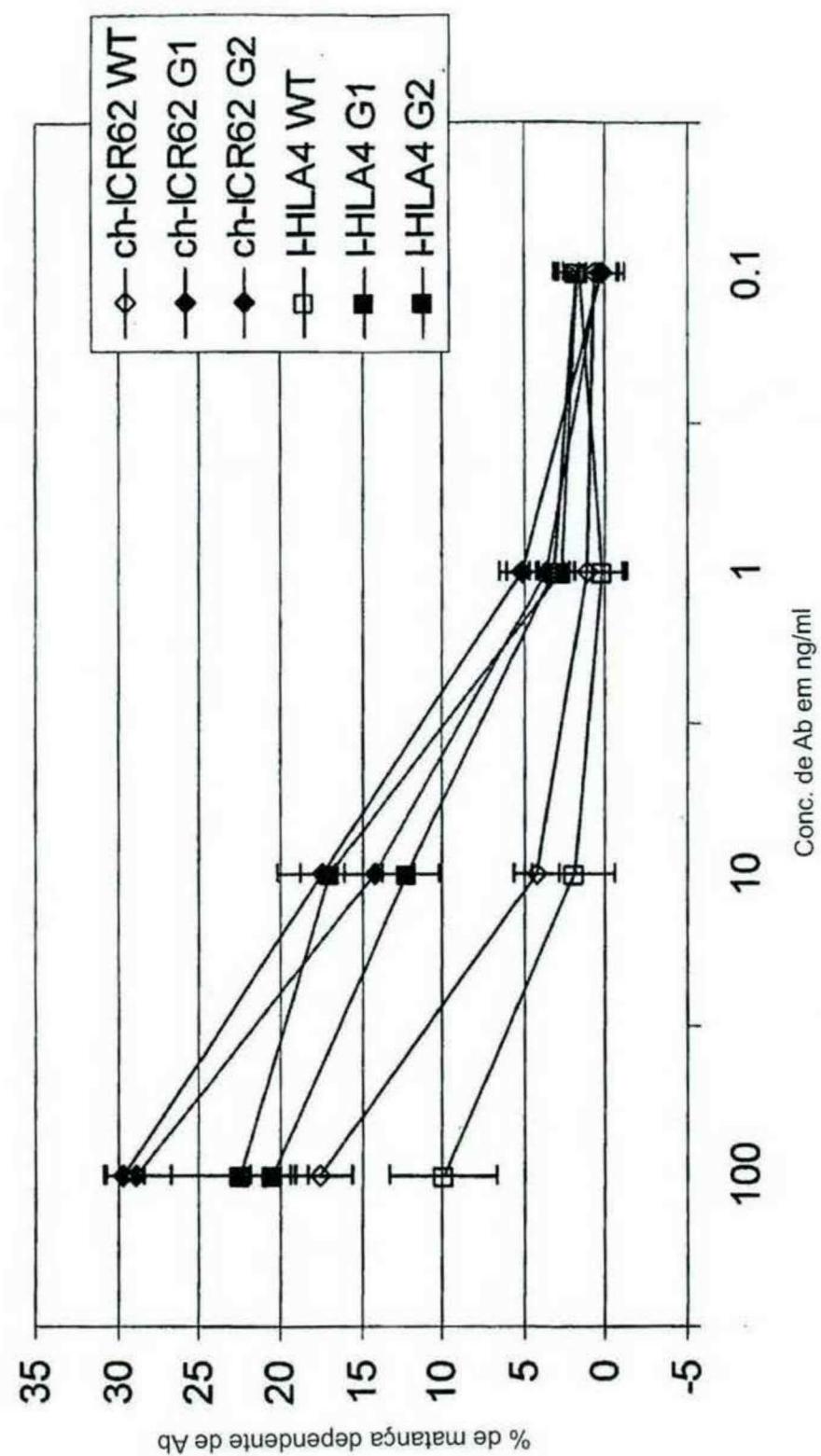


Fig. 9

Fig. 10a
(Células alvo LN229)

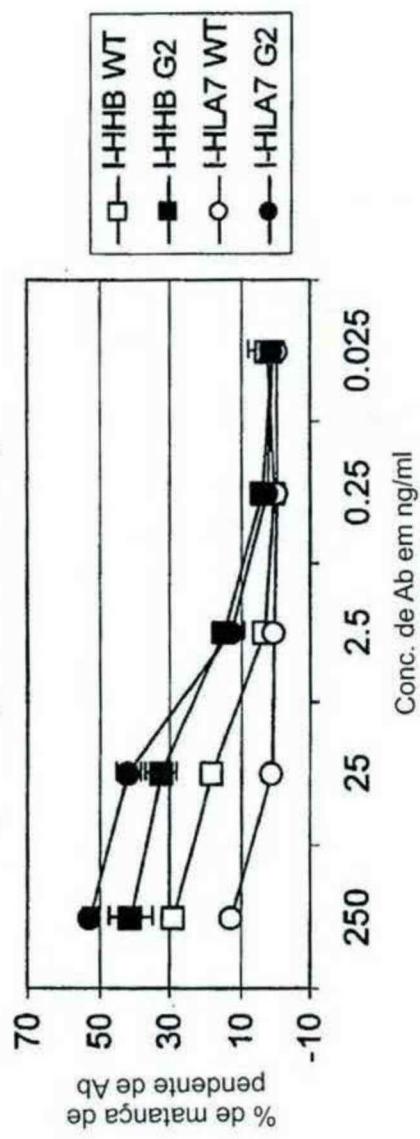
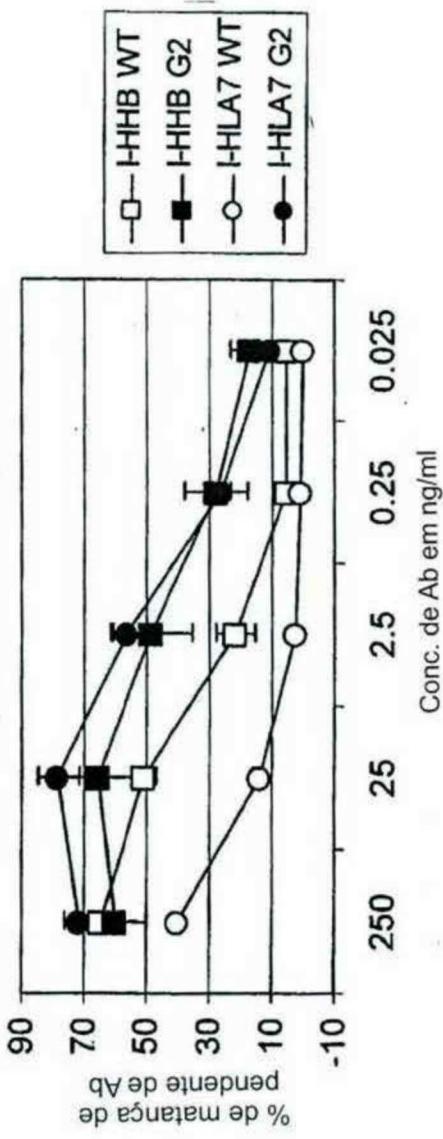


Fig. 10b
(Células alvo A431)



11/29

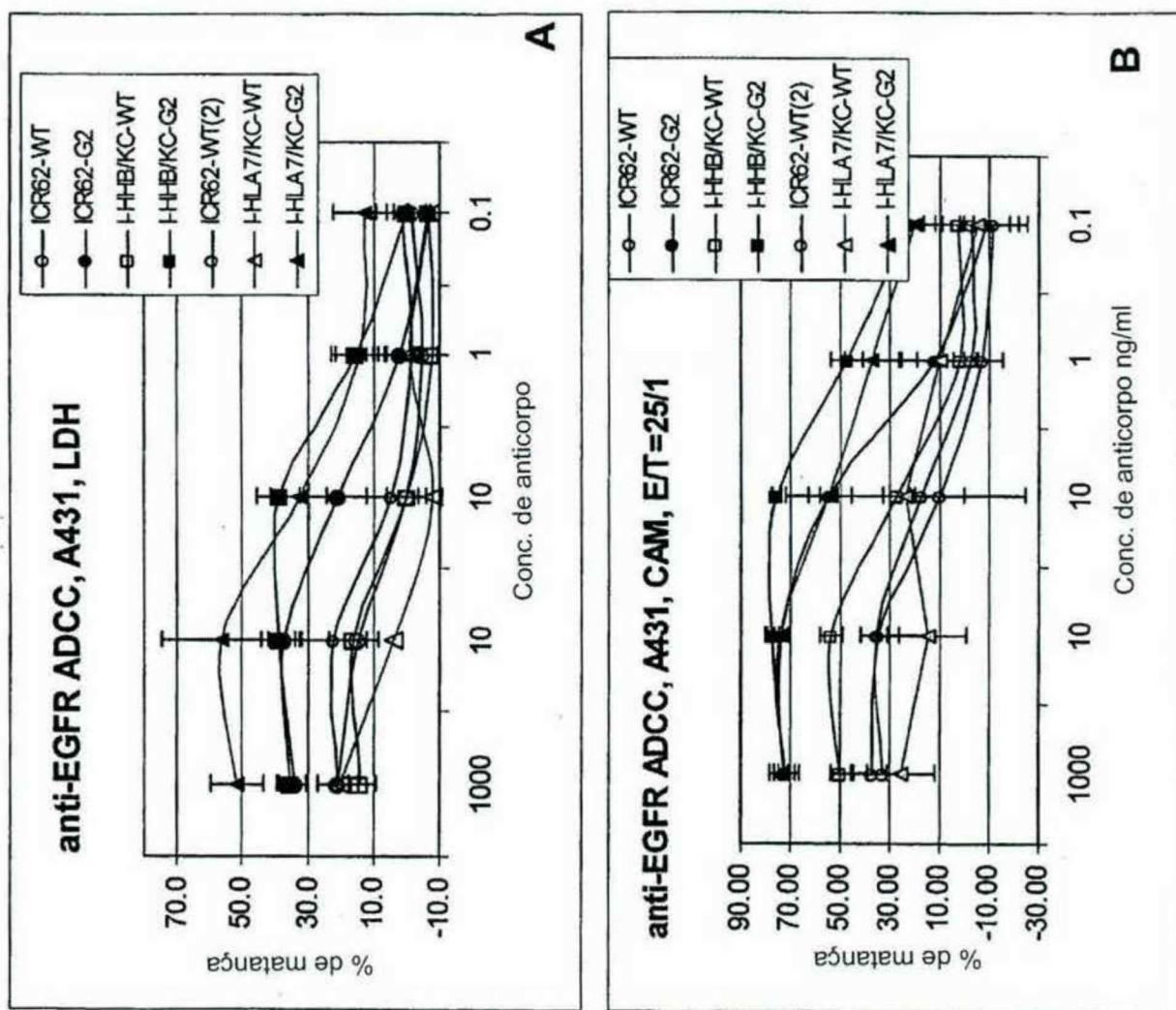


Fig. 11

12/29

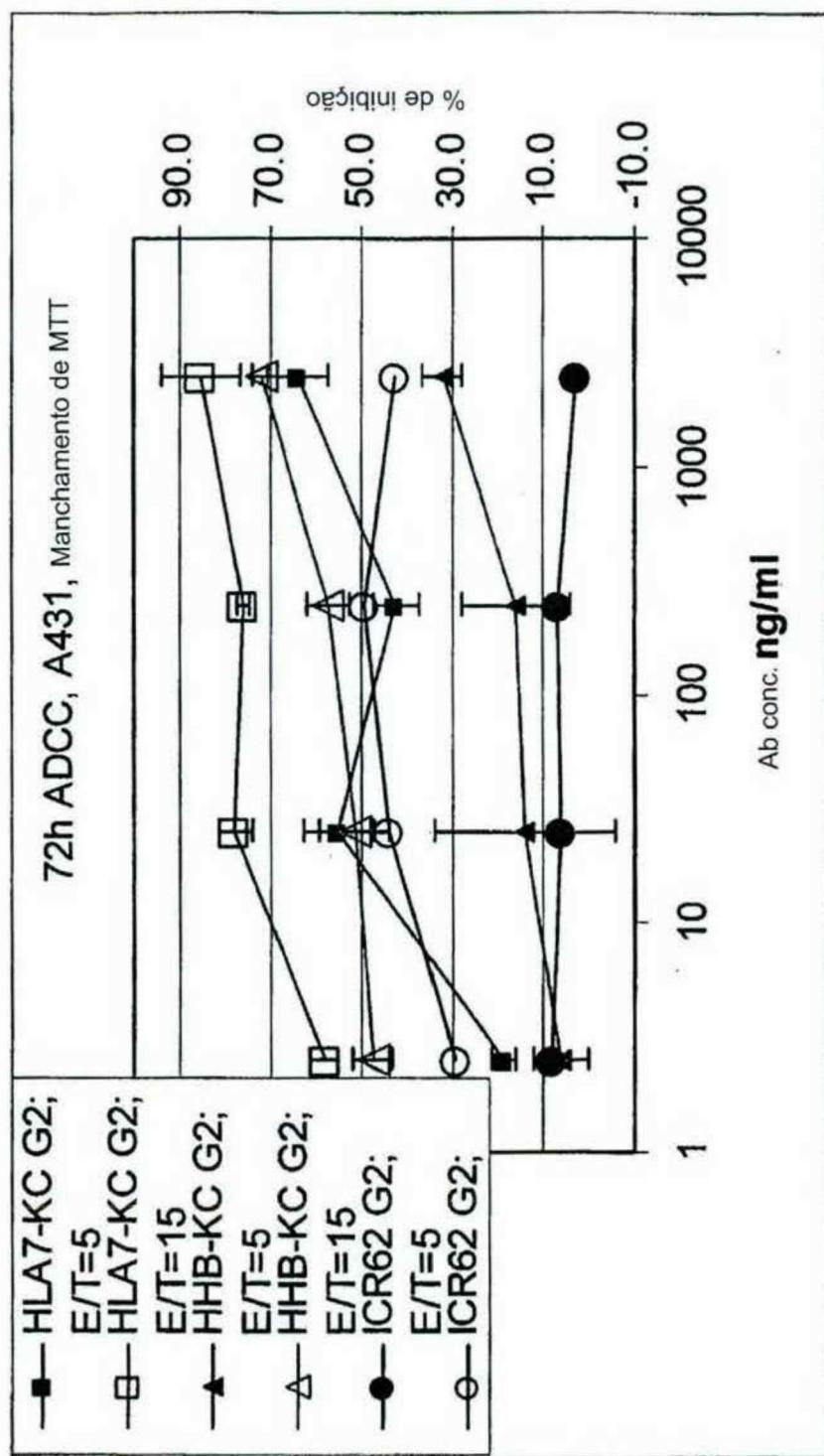


Fig. 12

13/29

ICR62-VH	1 QVNLLQSGAALVKGASVKLICKSGFTFTDYKTHWVQOSHGKSLEWIGYFNPNGYSTNEKFKSKATLTADKSTDAYMELTSLTSED
I-HHA.pep	1 .Q.V...EVK..S..V..A.....A.S..R.AP.QG..M.GI.....AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HHB.pep	1 .Q.V...EVK..S..V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HHC.pep	1 .Q.V...EVK..S..V.....R.AP.QG..M.....RV.I.....S...S.R...
I-HHD.pep	1 .Q.V...EVK..S..V..A.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HHE.pep	1 .Q.V...EVK..S..V.....S..R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HHF.pep	1 .Q.V...EVK..S..V.....R.AP.QG..M.....N.AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HHG.pep	1 .Q.V...EVK..S..V.....R.AP.QG..M.....A..AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HLA.pep	1 .Q.V...EVK..V..A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....AQ..QGRV.M.....T.IS...SR.R.D.
I-HLB.pep	1 .Q.V...EVK..V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.M.....T.IS...SR.R.D.
I-HLC.pep	1 .Q.V...EVK..V.....R.AP.QG..M.....R.AP.QG..M.....RV.M...T.IS...SR.R.D.
I-HLA1.pep	1 .Q.V...EVK..V..A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA2.pep	1 .Q.V...EVK..V..A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA3.pep	1 .Q.V...EVK..V..A..Y.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA4.pep	1 .Q.V...EVK..V..A..Y.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA5.pep	1 .MQ.V...PEVK..T..V..A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA6.pep	1 .MQ.V...PEVK..T..V..A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA7.pep	1 .MQ.V...PEVK..T..V..A.....R.AR.QR...WI.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.
I-HLA8.pep	1 .MQ.V...PEVK..T..V..A.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HLA9.pep	1 .E.Q.V...EVK..E.L.I...YS.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S...S.R...
I-HLA10.pep	1 .E.Q.V...EVK..E.L.I...YS.....R.MP..G..M.....SPS.QGQV.IS...IS...LQWS..KAS.

ICR62-VH-wt	91 SATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGSASVTVSS
I-HHA.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HHB.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HHC.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HHD.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HHB.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HHF.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HHG.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HLA.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HLB.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HLC.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HLA1.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA2.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA3.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA4.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA5.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA6.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA7.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....
I-HLA8.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HLA9.pep	91 T.V..A.....TT.....TT.....
I-HLA10.pep	91 T.M..A.....TT.....TT.....

Fig. 13

14/29

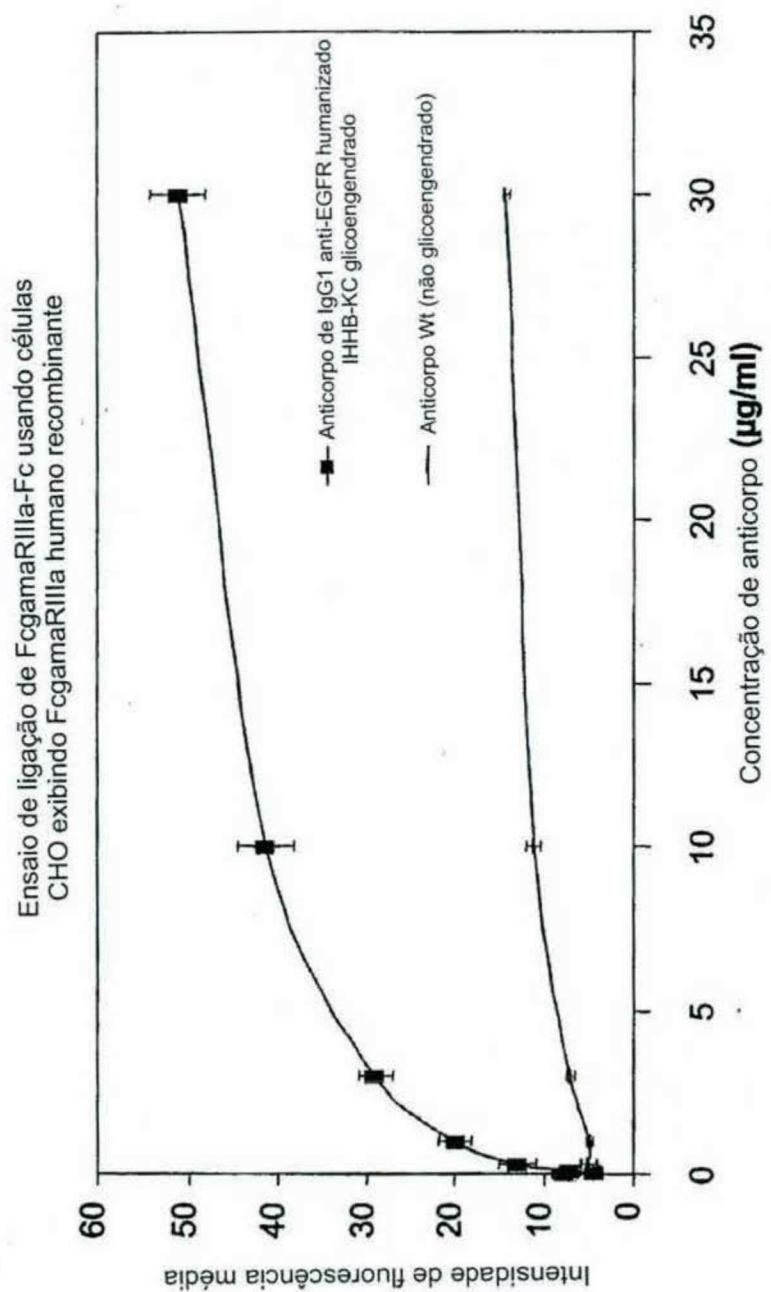
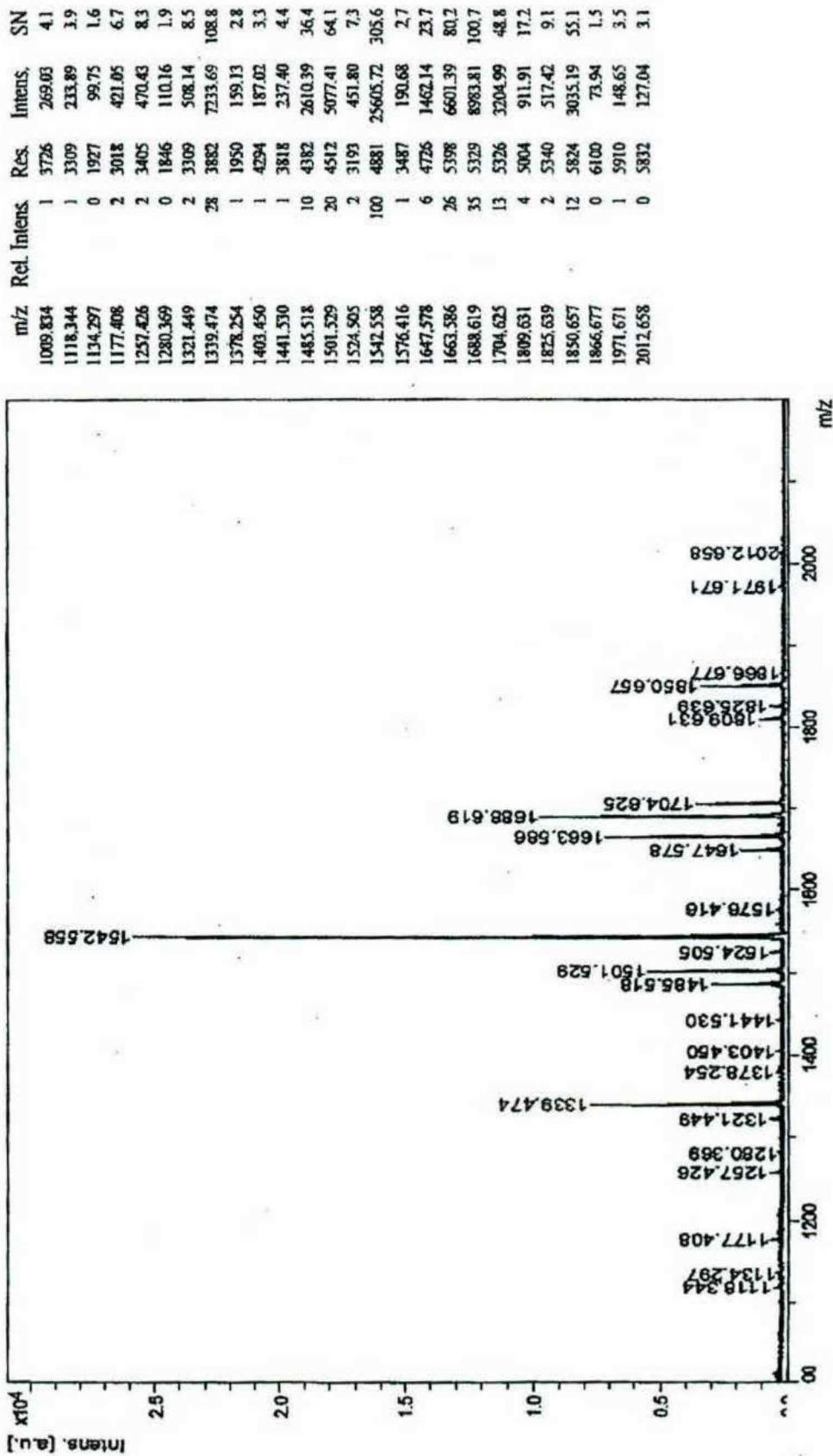


Fig. 14

15/29

Fig. 15

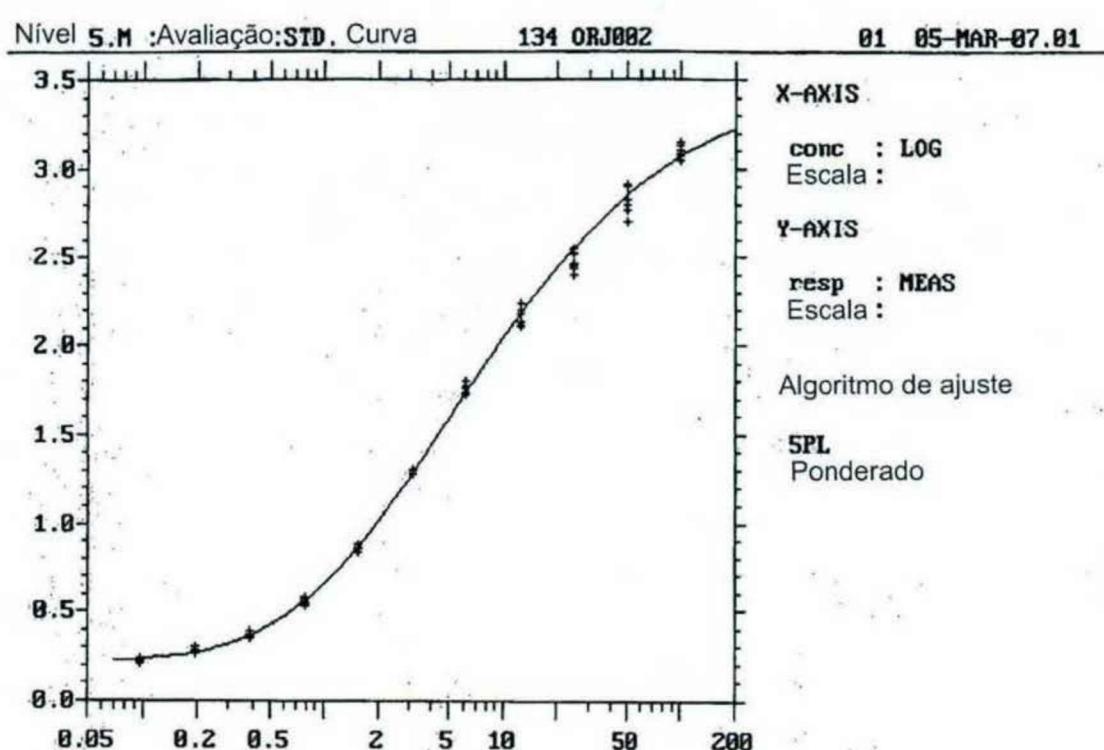
Perfil de oligossacarídeo MALDI/TOF-MS para anticorpo de IgG1 anti-EGFR humanizado glicoengendrado IHHB-KC



16/29

Fig. 16

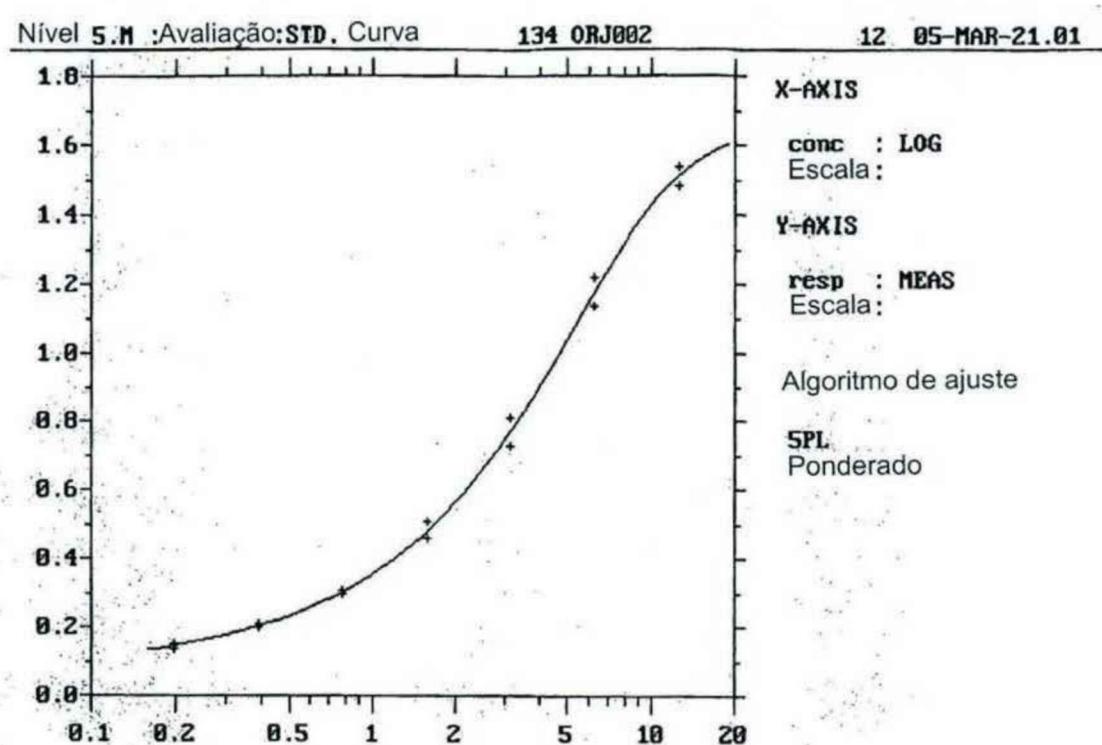
Perfil de precisão de anti-EGFR



17/29

Fig. 17

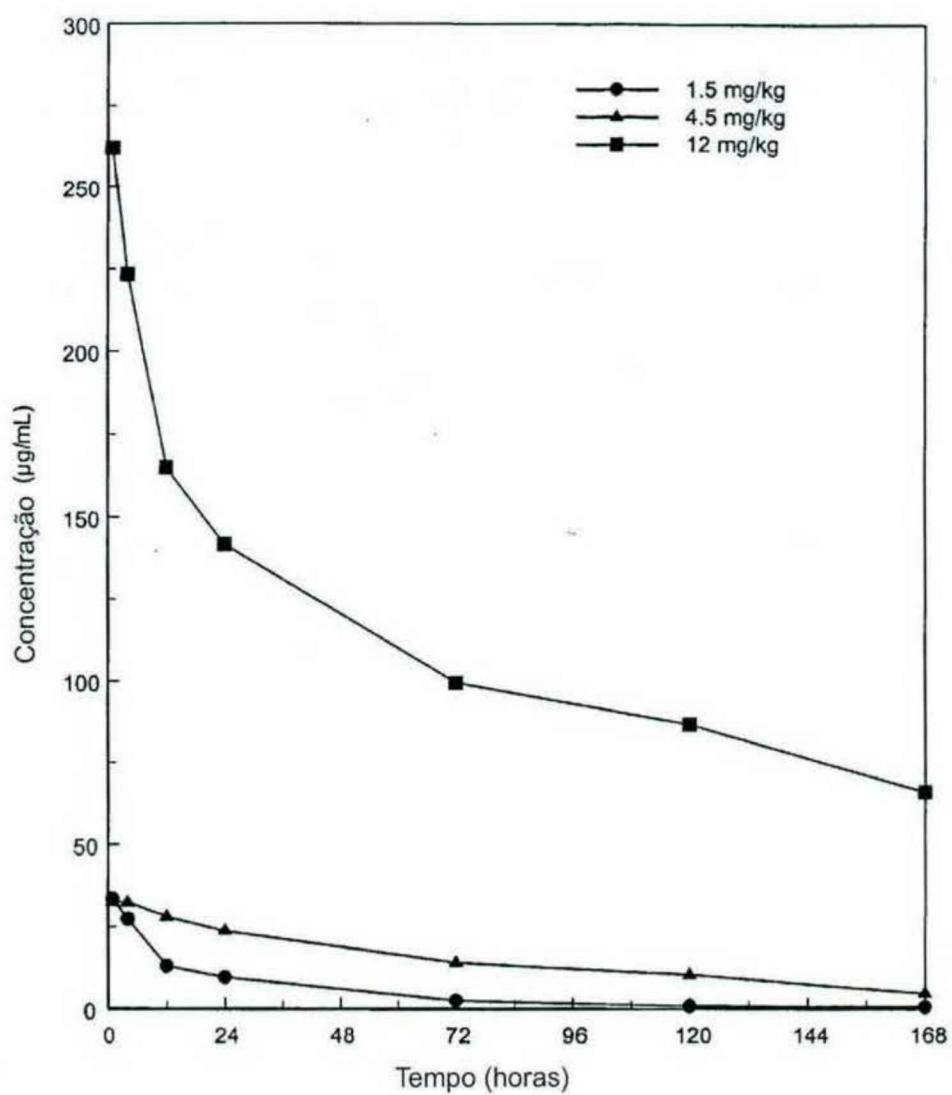
Curva de calibração de anti-EGFR representativa



18/29

Fig. 18

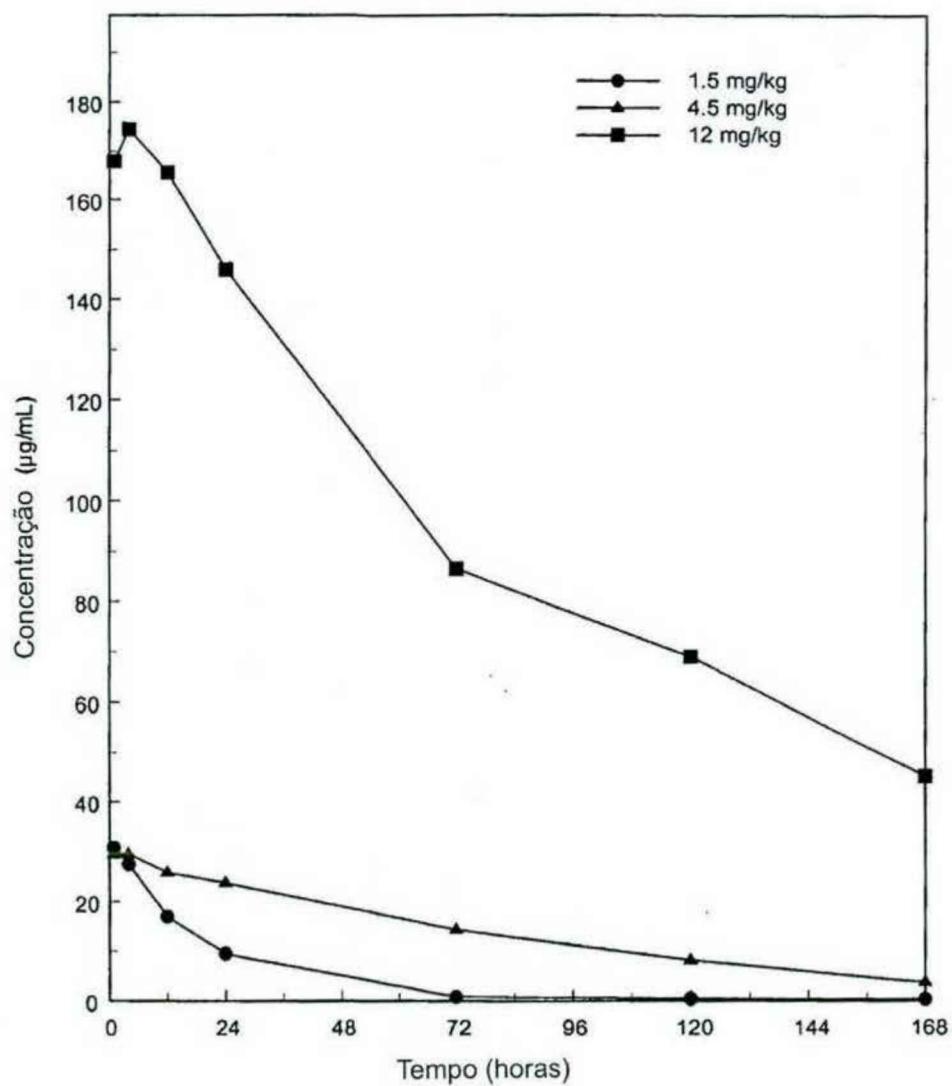
Concentrações séricas de anti-EGFR no Dia 1 de administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos caranguejeiros machos



19/29

Fig. 19

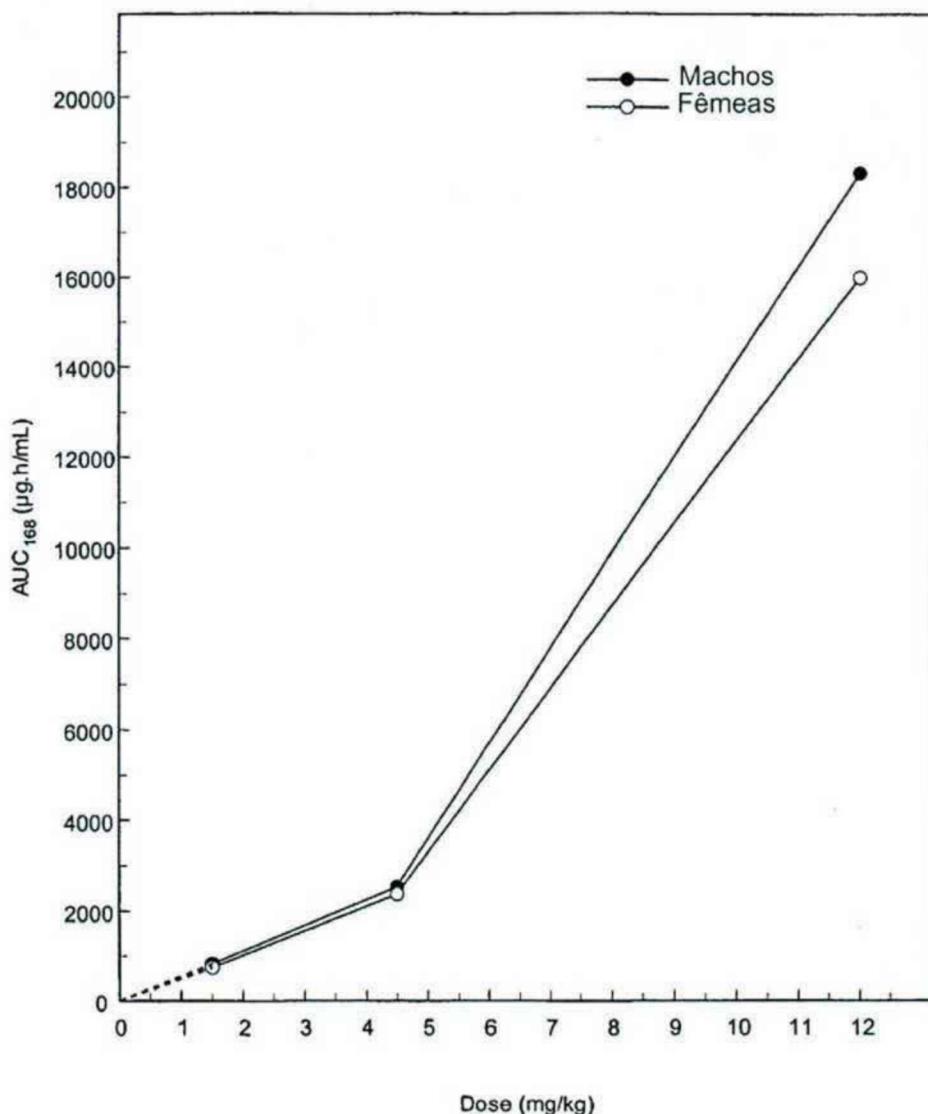
Concentrações séricas de anti-EGFR no Dia 1 de administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos carangueeiros fêmeas



20/29

Fig. 20

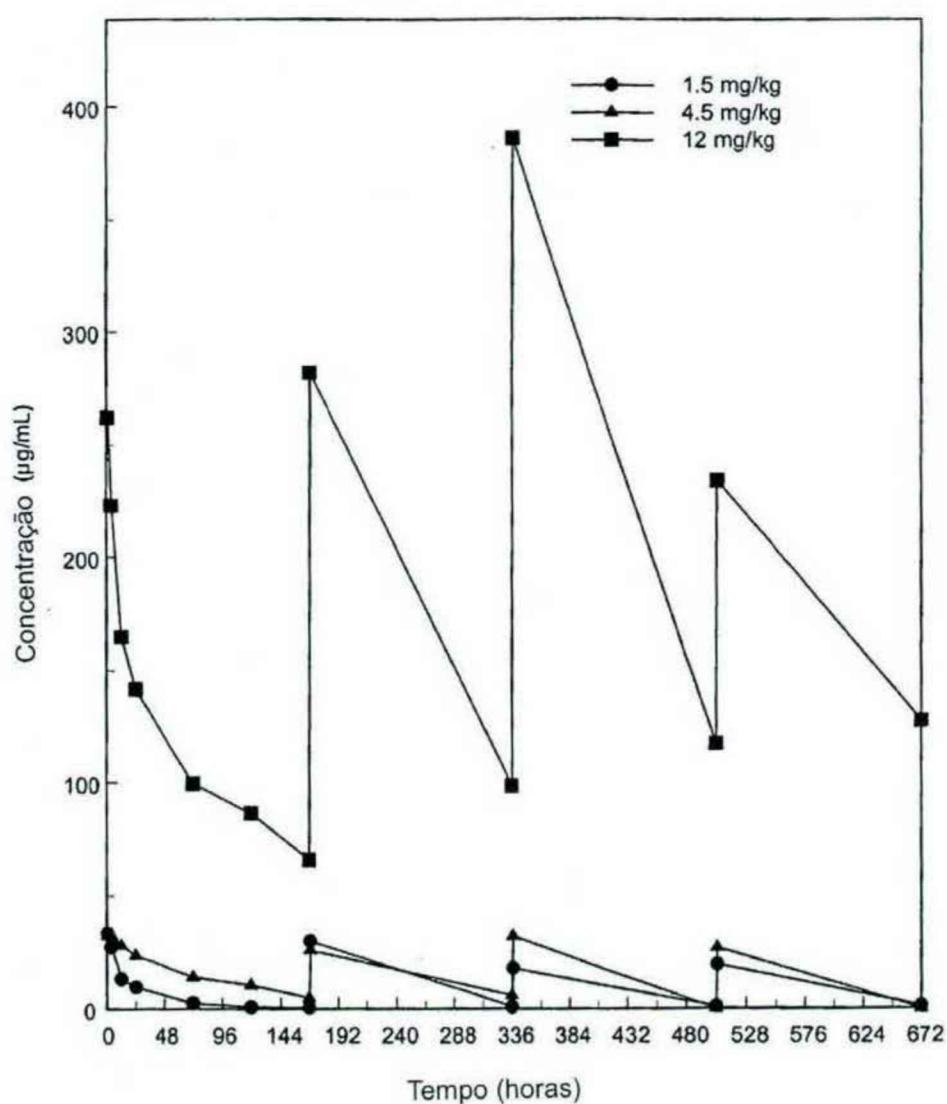
Relacionamento entre áreas sob curvas de concentração-tempo de anti-EGFR no soro (AUC_{168}) e nível de dose no Dia 1 de administração intravenosa semanal de anti-EGFR aos macacos-caranguejeiros



21/29

Fig. 21

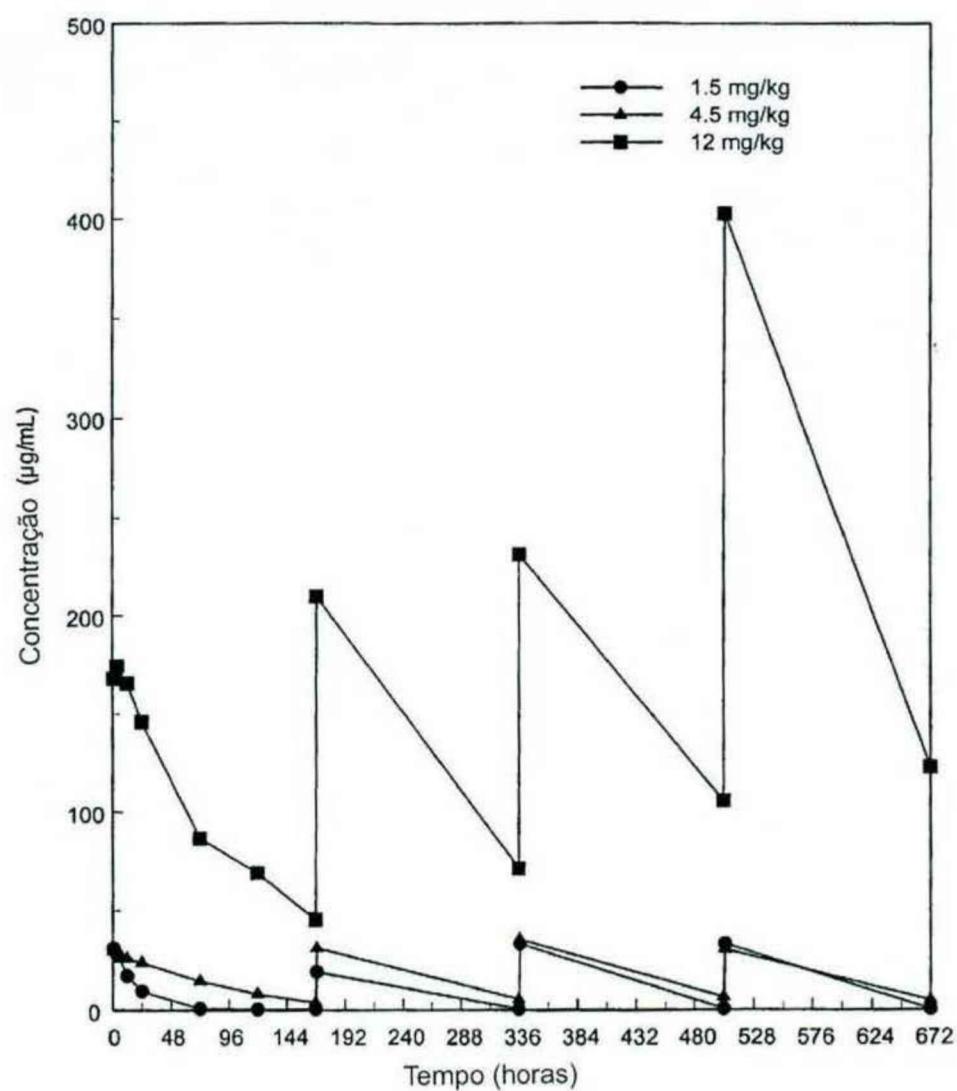
Concentrações séricas de anti-EGFR durante a administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos carangueeiros machos



22/29

Fig. 22

Concentrações séricas de anti-EGFR durante a administração intravenosa semanal de anti-EGFR a macacos caranguejeiros fêmeas



23/29

Fig. 23

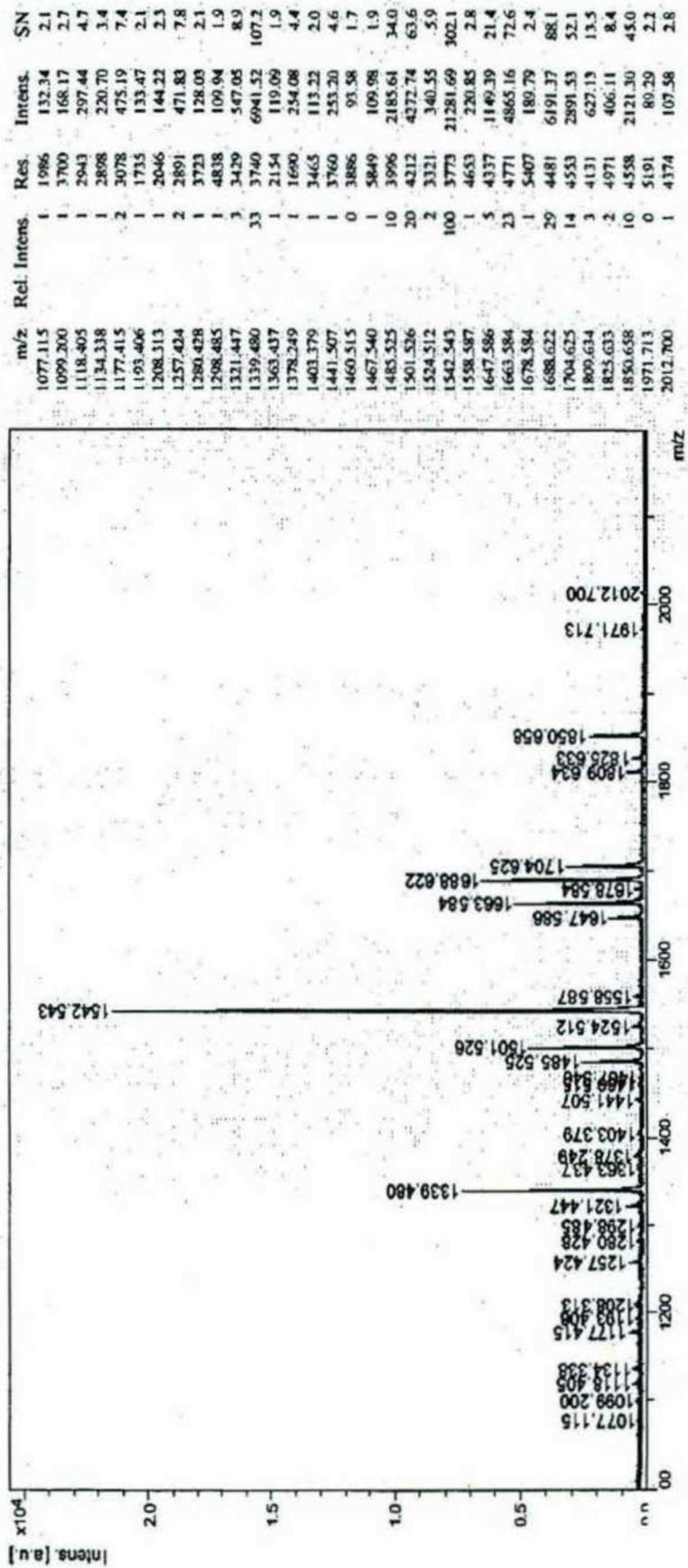
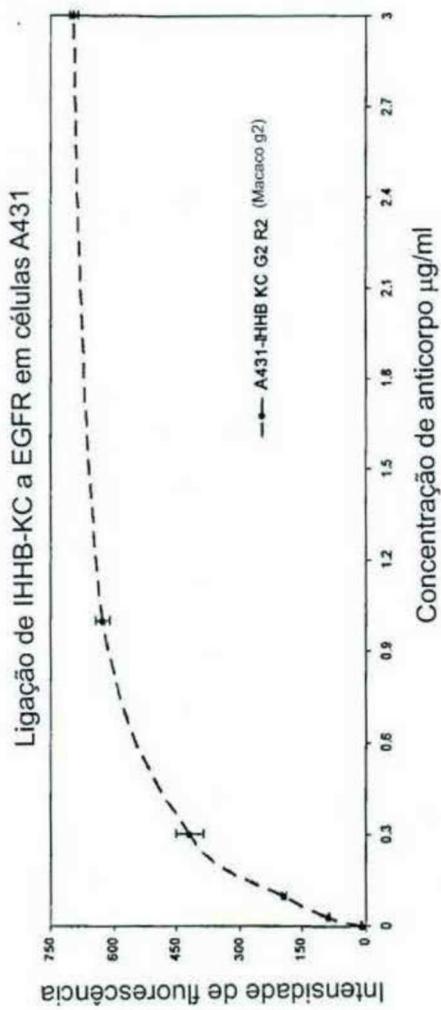
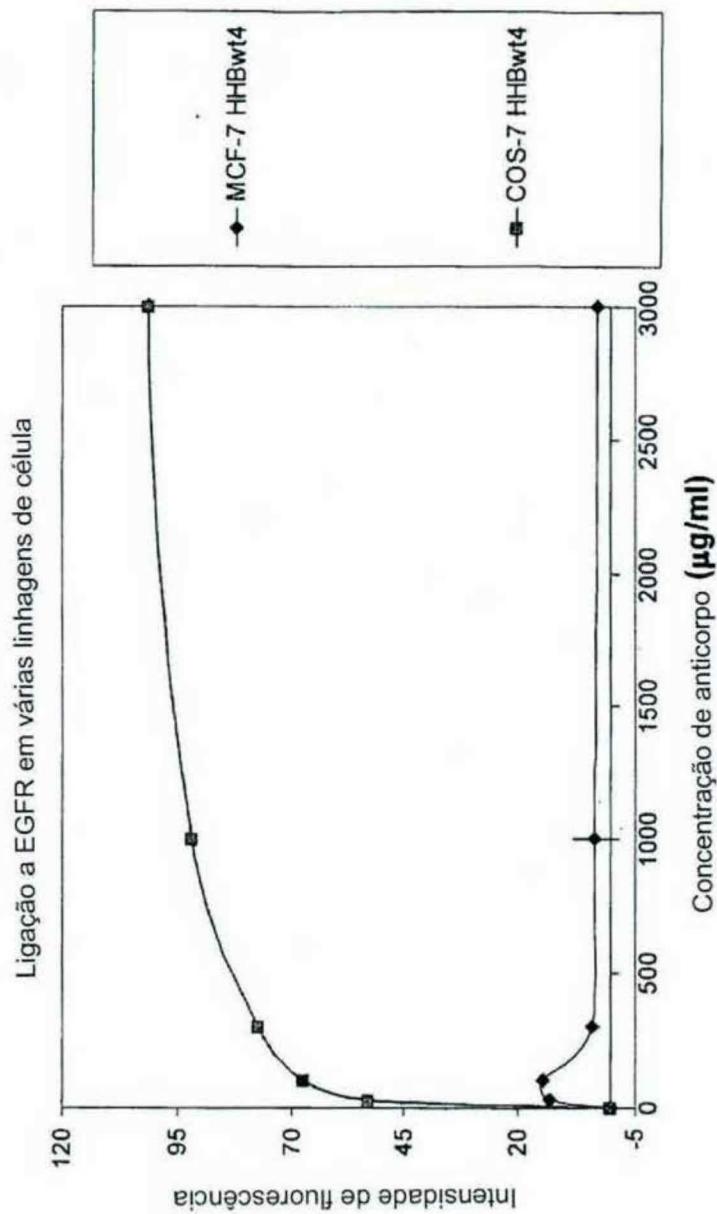
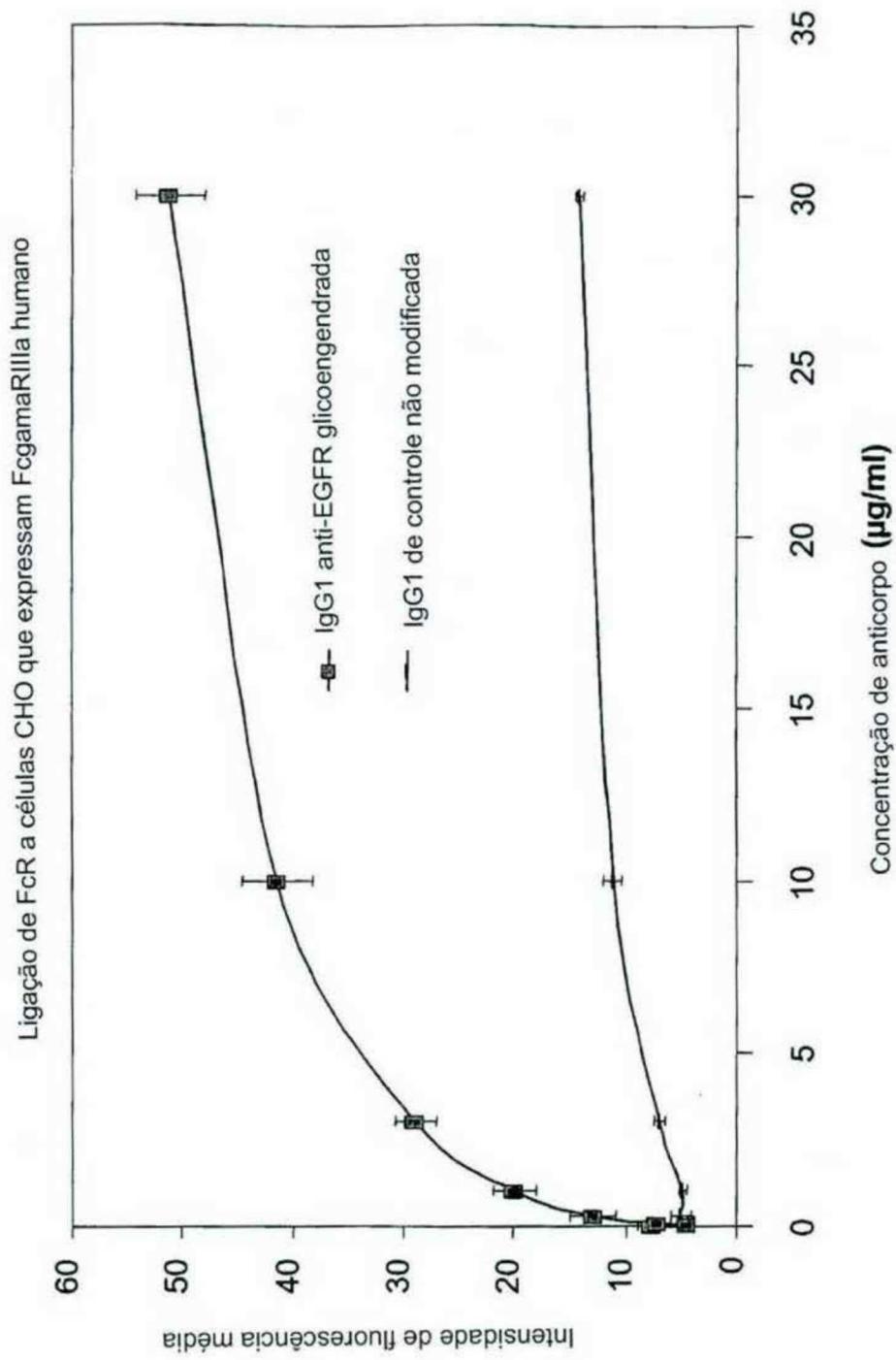


Fig. 24

25/29

Fig. 25

26/29

Fig. 26

27/29

Fig. 27

Ensaios de ADCC de 4h usando células (T) alvo A-549. ADCC medida pelo método com base na liberação de LDH. PBMCs humanas efetoras (E), razão de E:T = 25:1

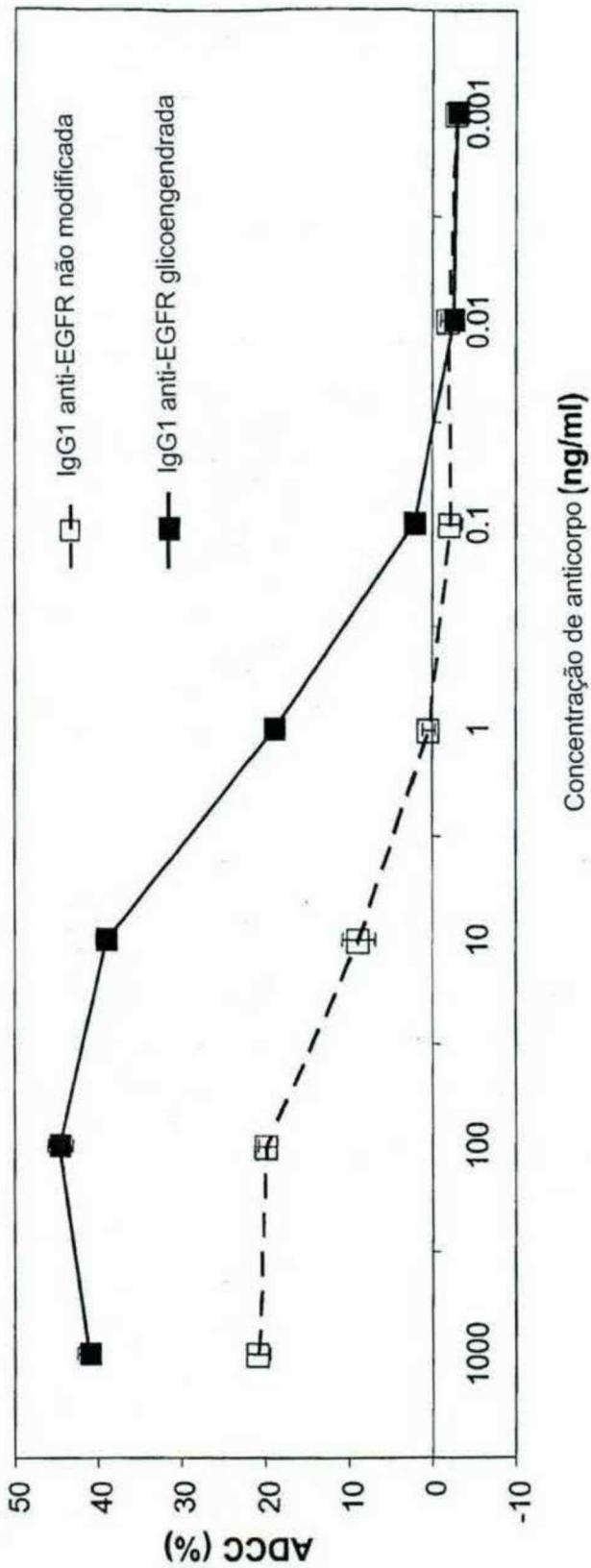
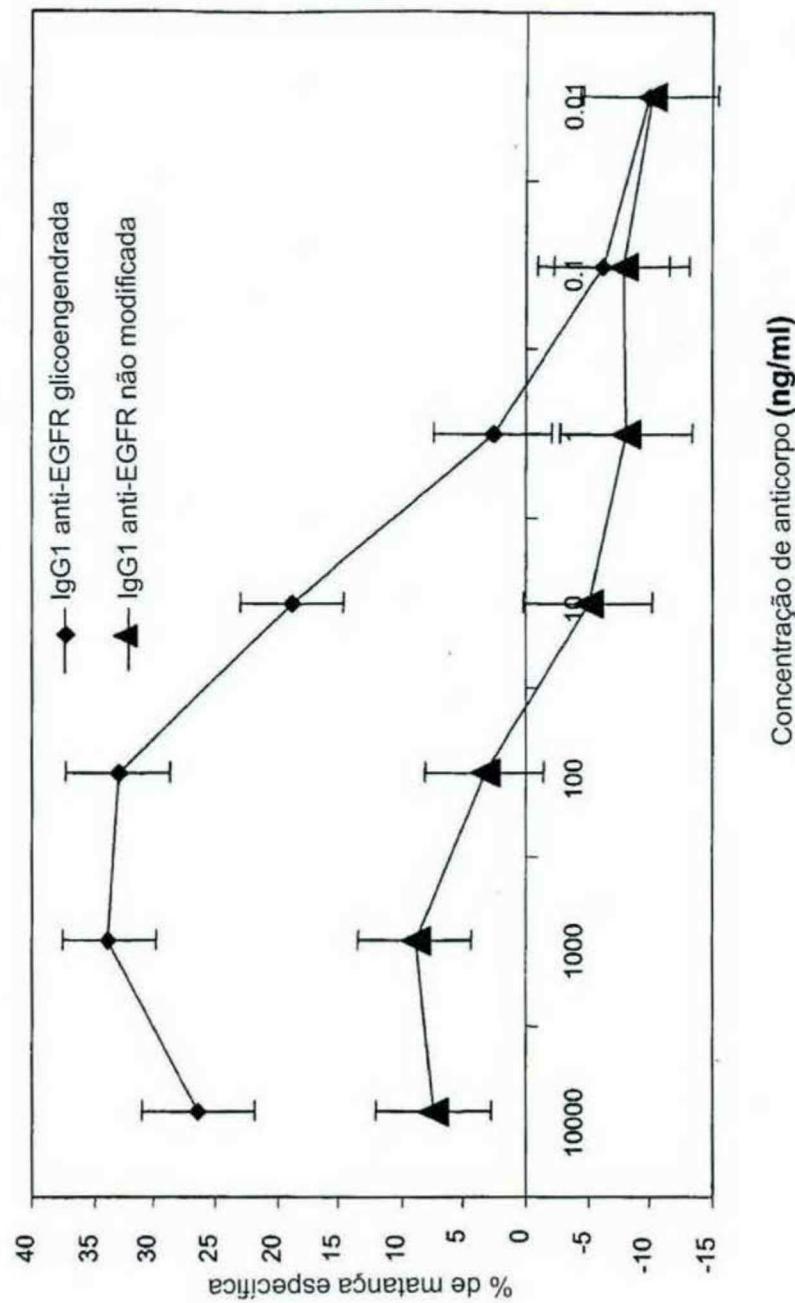


Fig. 28

Ensaio de ADCC de 4h usando células (T) alvo CYNOM-K1. ADCC medida pelo método com base na liberação de LDH. PBMCs humanas efetoras (E), razão de E:T = 25:1



29/29

Fig. 29

Ligaçāo alvo de EGFR com cēlulas alvo A431

