

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

(21) **PI0613279-0 A2**

(22) Data de Depósito: 20/06/2006
(43) Data da Publicação: 28/12/2010
(RPI 2086)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28
A61P 35/00
A61P 35/02

(54) Título: **ANTICORPO MANOCLONAL ISOLADO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-CD19, MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS EXPRESSANDO CD19, E MÉTODO PARA DEPLEÇÃO DE CELULAS B NUM INDIVÍDUO**

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2005 US 60/692,531, 08/12/2005 US 60/748,956, 06/06/2006 US 60/804,083, 20/06/2005 US 60/692,531, 06/06/2006 US 60/804,083, 08/12/2005 US 60/748,956, 20/06/2005 US 60/692,531, 06/06/2006 US 60/804,083, 06/06/2006 US 60/804,083

(73) Titular(es): Medarex, Inc.

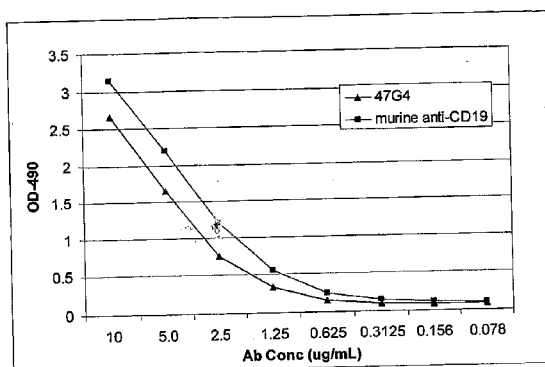
(72) Inventor(es): Alasdair Fraser Bell, Chetana Rao-Naik, Chin Pan, David B. Passmore, David John King, Haichun Huang, Jie Liu, Josephine M. Cardarelli, Sharline Chen, To Uyen Thi Do

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT US2006024183 de 20/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/002223de 04/01/2007

(57) Resumo: "ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA DE ACIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSAO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-CD19, MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS EXPRESSANDO CD19 E MÉTODO PARA DEPLEÇÃO DE CELULAS B NUM INDIVÍDUO. A presente descrição provê anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos que ligam-se especificamente a CD19 com alta afinidade. As moléculas de ácido nucleico que codificam tais anticorpos CD19, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos CD19 são também providos. Imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos CD19 são também providos. Métodos para detectar CD19, bem como métodos para tratar diversas malignidades de célula B, incluindo linfoma não-Hodgkin, são também descritos.



"ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-CD19, MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS EXPRESSANDO CD19 E MÉTODO PARA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B NUM INDIVÍDUO".

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

O CD19 é um receptor de membrana de 95 kDa que é expressado inicialmente na diferenciação da célula B e que continua a ser expressado até que as células B sejam ativadas para diferenciação terminal (Pezzutto et al., (1987), J Immunol 138:2793; Tedder et al (1994) Immunol Today 15:437). O domínio extracelular CD19 contém dois domínios similares a imunoglobulina (IG) do tipo C2 separados por um domínio menor ligado potencialmente a dissulfeto. O domínio citoplásmico CD19 é estruturalmente inédito, porém altamente conservado entre humano, de camundongo, e de porquinho-da-índia (Fujimoto et al., (1998) Semin Immunol. 10:267). O CD19 é parte de um complexo protéico encontrado na superfície celular de linfócitos B. O complexo protéico inclui CD19, CD21 (receptor de complemento, tipo 2), CD81 (TAPA-1) e CD225 (Leu-13) (Fujimoto, supra).

O CD19 é um importante regulador de sinais transmembrânicos nas células B. Um aumento ou redução na densidade da superfície celular de CD19 afeta o desenvolvimento e função da célula B, resultando em doenças tais como autoimunidade ou hipogamaglobulinemia (Fujimoto, supra). O complexo CD19 potencializa a resposta de células B a antígeno in vivo através da reticulação de dois complexos de transdução de sinal separados encontrados em membranas de células B. Os dois complexos de transdução de sinal, associados com a membrana IgM e CD19, ativam a fosfolipase C (PLC) através de mecanismos diferentes. A reticulação de CD19 e de receptor célula B reduz o número de moléculas IgM

necessárias para ativar a PLC (Fujimoto, supra; Ghetie, supra). Adicionalmente, o CD19 funciona como uma proteína adaptadora especializada para a amplificação de quinases da família Arc (Hasegawa et al., (2001) J Immunol 5 167:3190).

A ligação a CD19 demonstrou que não só aumenta como inibe a ativação e proliferação de célula B, dependendo da quantidade de reticulação que ocorrer (Tedder, supra). O CD19 é expressado em mais de 90% de linfomas de célula B, sendo previsto que afeta o crescimento de linfomas in vitro e in vivo (Ghetie, supra). Os anticorpos gerados para CD19 são anticorpos murinos. Uma desvantagem ao utilizar um anticorpo murino no tratamento de indivíduos humanos é a resposta ao anticorpo humano anti-camundongo (HAMA) quando da administração ao paciente. Conseqüentemente, existe a necessidade de anticorpos terapêuticos melhorados contra CD19 que sejam mais eficazes no tratamento e/ou na prevenção de doenças mediadas por CD19.

20 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos, que liguem-se a CD10 e que exibam numerosas propriedades desejáveis. Essas propriedades incluem ligação de alta afinidade a CD19 humano. São também providos métodos para tratar uma variedade de doenças mediadas por CD19 utilizando os anticorpos e composições da invenção.

Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal humano, ou a uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo:

- (a) liga-se a CD19 humano com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos;
- (b) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano, embora em concretizações alternativas, o anticorpo possa ser um anticorpo murino, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

Numa concretização, o anticorpo liga-se a CD19 humano

com um K_D de $5 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $2 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $5 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $4 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $3 \times 10^{-9}M$ ou menos, ou liga-se a CD19 humano com um K_D de $2 \times 10^{-9}M$ ou menos.

Em outra concretização, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou a uma porção ligante ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo faz competição cruzada para ligar-se a CD19 com um anticorpo de referência, sendo que o anticorpo: (a) liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos; e (b) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi. Em diversas concretizações, o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:8; ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9; ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10; ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:3; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:11; ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de

SEQ ID NO:12;

ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13;

ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6 e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:14;

ou o anticorpo de referência compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7 e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou a uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 5-51 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. A invenção também provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-69 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L18 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K A27 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. A invenção provê ainda um

anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L15 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19.

Em uma concretização preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo (a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 5-51 ou 1-69; e (b) uma região variável de cadeia leve de um V_K L18, A27, ou V_K L15 humano; sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19.

Em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3; e uma região variável de cadeia leve que compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3; sendo que (a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 e suas modificações conservativas; (b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58, e suas modificações conservativas; (c) o anticorpo liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos; e (d) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

Preferivelmente, a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29, e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOs: 44, 45, 46, 47,

48, 49 e 50, e suas modificações conservativas. Preferivelmente, a sequência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, e suas modificações conservativas; e a sequência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOs: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, e suas modificações conservativas.

Uma combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 16;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 23;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 30;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 37;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 44; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 51.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 16;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 23;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 30;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 37;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 44; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 52.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 17;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 24;

5 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 31;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 38;

10 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 45; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 53.

Outra combinação preferida compreende:

15 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 18,

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 25;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 32;

20 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 39;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 46; e

25 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 54.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 19;

30 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 26;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 33;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 40;

35 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 47; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 55.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 20;

5 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 27;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 34;

10 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 41;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 48; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 56.

15 Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 21;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 28;

20 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 35;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 42;

25 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 49; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 57.

Outra combinação preferida compreende:

30 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 22;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 29;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 36;

35 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 43;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 50; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 58.

Outros anticorpos preferidos da invenção, ou as porções
5 ligantes ao antígeno dos mesmos, compreendem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma
10 sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19.

Uma combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de
15 aminoácido de SEQ ID NO:1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:8.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de
20 aminoácido de SEQ ID NO:1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:9.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de
25 aminoácido de SEQ ID NO:2; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:10.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de
30 aminoácido de SEQ ID NO:3; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:11.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de
35 aminoácido de SEQ ID NO:4; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:12.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de
 5 SEQ ID NO:13.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de
 10 SEQ ID NO:14.

Outra combinação preferida compreende: (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de
 15 SEQ ID NO:15.

Em outro aspecto da invenção, anticorpos ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, são providos e competem para ligar-se a CD19 com qualquer um dos anticorpos anteriormente mencionados.

20 Os anticorpos da invenção podem ser, por exemplo, anticorpos de extensão completa, como por exemplo, o isótipo IgG1 ou IgG4. Alternativamente, os anticorpos podem ser fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab, Fab' ou Fab'2, ou anticorpos de cadeia simples.

25 A invenção também provê um imunoconjugado compreendendo um anticorpo da invenção, ou uma porção ou um fragmento ligante ao antígeno do mesmo, ligado a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou um isótopo radioativo. A invenção também provê uma molécula
 30 biespecífica compreendendo um anticorpo, ou uma porção ou um fragmento ligante ao antígeno do mesmo, da invenção, ligada a uma segunda porção funcional tendo uma especificidade de ligação diferente da do dito anticorpo, ou da porção ligante ao antígeno do mesmo.

35 Também são providas composições compreendendo um anticorpo, ou uma porção ou um fragmento ligante ao antígeno do mesmo, ou imunoconjugado ou molécula

biespecífica da invenção e um portador farmacologicamente aceitável.

As moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos, ou as porções ou fragmentos ligante ao antígeno dos mesmos, da invenção são também abrangidos pela invenção, bem como os vetores de expressão compreendendo tais ácidos nucleicos e as células hospedeiras compreendendo tais vetores de expressão. Outras características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição e exemplos a seguir descritos, os quais não devem ser interpretados como restritivos. Os conteúdos de todas as referências, registros no Genbank, patentes e pedidos de patente publicados, citados em todo este pedido, são aqui expressamente incorporados por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:59) e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO:1) da região variável de cadeia pesada dos anticorpos monoclonais humanos 21D4 e 21D4a. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:16), CDR2 (SEQ ID NO:23) e CDR3 (SEQ ID NO:30) e indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

A Figura 1B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:66) e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO:8) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 21D4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:37), CDR2 (SEQ ID NO:44) e CDR3 (SEQ ID NO:51) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 1C mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:67) e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO:9) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 21D4a. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:37), CDR2 (SEQ ID NO:44) e CDR3 (SEQ ID NO:52) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 2A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:60) e a sequência de aminoácido (SEQ ID NO:2) da

região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 47G4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:17), CDR2 (SEQ ID NO:24) e CDR3 (SEQ ID NO:31) e indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

5 A Figura 2B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:68) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:10) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 47G4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:38), CDR2 (SEQ ID NO:45) e CDR3 (SEQ ID NO:53) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

10 A Figura 3A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:61) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:3) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 27F3. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:18), CDR2 (SEQ ID NO:25) e CDR3 (SEQ ID NO:32) e indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

15 A Figura 3B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:69) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:11) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 27F3. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:39), CDR2 (SEQ ID NO:46) e CDR3 (SEQ ID NO:54) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

20 A Figura 4A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:62) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:4) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 3C10. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:19), CDR2 (SEQ ID NO:26) e CDR3 (SEQ ID NO:33) e indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

25 A Figura 4B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:70) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:12) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 3C10. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:40), CDR2 (SEQ ID NO:47) e CDR3 (SEQ ID NO:55) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

30 A Figura 5 mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:63) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:5) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal

humano 5G7. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:20), CDR2 (SEQ ID NO:27) e CDR3 (SEQ ID NO:34) e indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

5 A Figura 5B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:71) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:13) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 5G7. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:41), CDR2 (SEQ ID NO:48) e CDR3 (SEQ ID NO:56) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

10 A Figura 6A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:64) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:6) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 13F1. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:28) e CDR3 (SEQ ID NO:35) e
15 indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

A Figura 6B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:72) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:14) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 13F1. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID
20 NO:42), CDR2 (SEQ ID NO:49) e CDR3 (SEQ ID NO:57) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 7A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:65) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:7) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal
25 humano 46E8. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:22), CDR2 (SEQ ID NO:29) e CDR3 (SEQ ID NO:36) e indicadas as derivações de linha germinal V, D e J;

A Figura 7B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:73) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:15) da
30 região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 46E8. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:50) e CDR3 (SEQ ID NO:58) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 8 mostra o alinhamento da seqüência de
35 aminoácido da região variável de cadeia pesada de 21D4 (SEQ ID NO:1) e 21D4a (SEQ ID NO:1) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_H 5-51 (SEQ ID

NO:74). A linha germinal JH4b é descrita como SEQ ID NO:80;

5 A Figura 9 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 47G4 (SEQ ID NO:2) com as sequências de aminoácido de linha germinal humana V_H 1-69 (SEQ ID NO:75). A linha germinal JH5b é descrita como SEQ ID NO:81;

10 A Figura 10 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 27F3 (SEQ ID NO:3), com a sequência de aminoácido de linha germinal humana V_H 5-51 (SEQ ID NO:74). A linha germinal JH6b é descrita como SEQ ID NO:82;

15 A Figura 11 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 3C10 (SEQ ID NO:4) com a sequência de aminoácido de linha germinal humana V_H 1-69 (SEQ ID NO:75). A linha germinal JH6b é descrita como SEQ ID NO:82;

20 A Figura 12 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 5G7 (SEQ ID NO:5) com a sequência de aminoácido de linha germinal humana V_H 5-51 (SEQ ID NO:74). A linha germinal JH6b é descrita como SEQ ID NO:83;

25 A Figura 13 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 13F1 (SEQ ID NO:6) com a sequência de aminoácido de linha germinal humana V_H 5-51 (SEQ ID NO:74). A linha germinal JH6b é descrita como SEQ ID NO:82;

30 A Figura 14 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 46E8 (SEQ ID NO:7) com a sequência de aminoácido de linha germinal humana V_H 5-51 (SEQ ID NO:74). A linha germinal JH6b é descrita como SEQ ID NO:82;

35 A Figura 15 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 21D4 (SEQ ID NO:8) com a sequência de aminoácido de linha germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO:76). A linha germinal JK2 é descrita como SEQ ID NO:84;

A Figura 16 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 21D4A (SEQ ID NO:9) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO:76). A linha germinal JK3 é descrita como SEQ ID NO:85;

A Figura 17 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 47G4 (SEQ ID NO:10) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K A27 (SEQ ID NO:77). A linha germinal JK3 é descrita como SEQ ID NO:85;

A Figura 18 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 27F3 (SEQ ID NO:11) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO:76). A linha germinal JK2 é descrita como SEQ ID NO:84;

A Figura 19 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 3C10 (SEQ ID NO:12) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K L15 (SEQ ID NO:78). A linha germinal JK2 é descrita como SEQ ID NO:84;

A Figura 20 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 5G7 (SEQ ID NO:13) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO:76). A linha germinal JK1 é descrita como SEQ ID NO:86;

A Figura 21 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 13F1 (SEQ ID NO:14) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO:76). A linha germinal JK2 é descrita como SEQ ID NO:87;

A Figura 22 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 46E8 (SEQ ID NO:15) com a seqüência de aminoácido de linha germinal humana V_K L18 (SEQ ID NO:76). A linha germinal JK2 é descrita como SEQ ID NO:87;

A Figura 23 é um gráfico mostrando os resultados de experimentos que demonstram que o anticorpo monoclonal

humano 47G4, dirigido contra o CD19 humano, liga-se especificamente a CD19 humano;

A Figura 24 é um gráfico onde constam os resultados de experimentos demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra o CD19 humano competem para ligar-se a células de Raji;

A Figura 25A-D mostra os resultados de experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 21D4, 21D4a, 47G4, 3C10, 5G7 e 13F1, dirigidos contra CD19 humano, ligam-se à superfície celular de linhagens celulares de tumor de célula B. (A) Citometria de fluxo de HuMAbs 21D4 e 47G4 em células CHO transfectadas com CD19 humano. (B) Citometria de fluxo de HuMAb 47G4 em células tumorais B Daudi. (C) Citometria de fluxo de HuMAbs e 47G4 em células-B tumorais de Raji. (D) Citometria de fluxo de HuMAbs 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7 e 13F1 em células-B tumorais de Raji;

As Figuras 26A-B mostram os resultados de experimentos de internalização demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 21D4 e 47G4, dirigidos contra CD19 humano penetra nas células-B tumorais de Raji expressando CHO-CD19 e CD19 através de um ensaio de liberação de 3H-timidina. (A) Internalização de HuMAb 47G4 em células CHO-CD19. (B) Internalização de HuMAbs 21D4 e 47G4 em células-B tumorais de Raji;

A Figura 27 mostra os resultados de um ensaio de incorporação de timidina demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra CD19 humano matam as células-B tumorais de Raji;

A Figura 28 mostra um gráfico Kaplan-Meier de sobrevivência de camundongo num modelo sistêmico Ramos.

A Figura 29 mostra a alteração no peso corporal de camundongo num modelo sistêmico Ramos;

A Figura 30A-B mostra os resultados de um estudo de modelo de tumor de camundongo in vivo, demonstrando que o tratamento com o anticorpo 21D4 anti-CD19 desnudo possui um efeito inibitório direto sobre tumores de linfoma in

vivo. (A) tumores ARH-77 (B) tumores Raji;

A Figura 31 mostra os resultados de um ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) demonstrando que os anticorpos anti-CD19 monoclonais humanos não-fucosilados possuem citotoxicidade celular aumentada sobre as células da leucemia humana de forma dependente de ADCC;

A Figura 32 mostra os resultados de um estudo de modelo de tumor em camundongo in vivo demonstrando que os anticorpos anti-CD19 conjugados a toxina reduzem o volume do tumor;

A Figura 33 mostra a alteração no peso corporal de camundongo num estudo de modelo de tumor Raji;

A Figura 34 mostra os resultados de um estudo em macaco cinomolgo mostrando uma população reduzida de células CD20+ após tratamento de HuMAbs anti-CD19 fucosilados ou não-fucosilados;

A Figura 35 mostra os resultados de macacos cinomolgos individuais após tratamento com HuMAbs anti-CD19 fucosilados ou não-fucosilados; e

A Figura 36A-C mostra os resultados de um ensaio de incorporação de timidina, demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra CD19 humano isoladamente ou conjugados a toxina matam células-B tumorais de Raji e SU-DHL-6.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente descrição refere-se a anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos que ligam-se especificamente a CD19 com alta afinidade. Em certas concretizações, os anticorpos da invenção são derivados de seqüências específicas de linha germinal de cadeia leve e pesada e/ou compreendem características estruturais específicas tais como regiões CDR compreendendo seqüências de aminoácido específicas. A invenção provê anticorpos isolados, métodos para preparar tais anticorpos, imunocjugados e moléculas biespecíficas compreendendo tais anticorpos, bem como

composições farmacêuticas contendo os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. A invenção também refere-se a métodos para utilizar os anticorpos, tal como para detectar CD19, bem como para

5 tratar doenças associadas com expressão de CD19, tais como malignidades de célula B que expressam CD19. Conseqüentemente, a invenção também provê métodos para utilizar os anticorpos anti-CD19 da invenção para tratar de malignidades de célula B, como por exemplo, no

10 tratamento de linfoma não-Hodgkin, leucemias linfocíticas crônicas, linfomas foliculares, linfomas difusos de grandes células de linhagem B e mielomas múltiplos. Para que a presente invenção possa ser melhor compreendida, são definidos certos termos em primeiro

15 lugar. As definições adicionais constam em toda a descrição detalhada.

O termo "CD19" refere-se, por exemplo, a variantes, isoformas, e homólogos de espécies de CD19 humano. Conseqüentemente, os anticorpos humanos da presente

20 descrição podem, em certos casos, ter reatividade cruzada com CD19 de espécies diferentes da humana. Em certas concretizações, os anticorpos podem ser completamente específicos para uma ou mais proteínas de CD19 humano e podem não exibir espécies ou outros tipos de reatividade

25 cruzada não-humana. A seqüência completa de aminoácido de um CD19 humano representativo possui o número de registro no Genbank NM_001770 (SEQ ID NO:79).

O termo "resposta imune" refere-se à ação, por exemplo, de linfócitos, células apresentadoras de antígeno,

30 células fagocíticas, granulócitos, e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta em dano seletivo a, destruição ou eliminação do corpo humano de patógenos invasores, células ou tecidos

35 infectados com patógenos, células cancerosas, ou, em casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

Uma "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre diversas moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. Conforme aqui utilizado, a expressão "receptor de superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão de tal sinal através da membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor de superfície celular" da presente invenção é o receptor CD19.

O termo "anticorpo", conforme aqui citado, inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento ligante ao antígeno (ou seja, "porção ligante ao antígeno") ou cadeias simples dos mesmos. Um "anticorpo" refere-se a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo. Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve compreende um único domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e de quatro FRs, dispostos de terminal amino para terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias leves e pesadas contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo diversas células do sistema imune (ex: células

efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

O termo "porção ligante ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), conforme aqui
 5 utilizado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que mantém a capacidade de ligar-se especificamente a um antígeno (ex: CD19). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada através de fragmentos de um anticorpo de
 10 extensão completa. Exemplos de fragmentos ligantes abrangidos pelo termo "porção ligante ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente
 15 compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobra ("hinge"); (iii) um fragmento Fab' que é essencialmente um Fab com parte da região de dobra (vide, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Paul ed. 3 sup.rd ed.1993)); (iv) um fragmento F_d consistindo dos
 20 domínios V_H e C_{H1} ; (v) um fragmento F_v consistindo dos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (vi) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de um domínio V_H ; (viii) um região determinante de complementaridade isolada (CDR) e (viii)
 25 um nanocorpo, uma região variável de cadeia pesada contendo um domínio variável simples e dois domínios constantes. Além disso, embora os dois domínios do fragmento F_v , V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos utilizando métodos
 30 recombinantes, através de um ligante sintético que permite que sejam preparados como uma cadeia de proteína simples na qual as regiões V_L e V_H emparelham-se para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia simples F_v (scFv); vide, por exemplo, Bird et al(1988)
 35 Science 242:423-426; e Huston et al.(1988) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples também pretendem ser abrangidos pelo termo

"porção ligante ao antígeno" de um anticorpo. Esses fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando-se técnicas convencionais conhecidas pelos habilitados na técnica, e os fragmentos são identificados quanto à
5 utilidade da mesma forma que os anticorpos intactos.

Um "anticorpo isolado", conforme aqui utilizado, pretende se referir a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (ex: um anticorpo isolado que especificamente
10 liga-se a CD19 é substancialmente livre de anticorpos que ligam-se especificamente a antígenos que não o CD19). Um anticorpo isolado que liga-se especificamente a CD19 pode, porém, ter reatividade cruzada com outros antígenos, tais como moléculas CD19 de outras espécies.
15 Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou substâncias químicas.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" conforme aqui utilizados, referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de
20 composição molecular simples. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma especificidade de ligação simples e afinidade por um epítopo específico.

O termo "anticorpo humano", conforme aqui utilizado,
25 pretende incluir anticorpos que possuem regiões variáveis nas quais tanto as regiões estruturais como as regiões CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Além disso, se o anticorpo conter uma região constante, a região constante também é
30 derivada de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos aminoácido não codificados por seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana (ex: mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou
35 sítio-específicas *in vitro* ou através de mutação somática *in vivo*). Porém, o termo "anticorpo humano", conforme aqui utilizado, não pretende incluir anticorpos nos quais

as seqüências CDR derivadas de linha germinal de outras espécies mamíferas, tal como um camundongo, foram enxertadas em seqüências estruturais humanas.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos exibindo uma especificidade de ligação simples e que possuem regiões variáveis nas quais tanto as regiões estruturais como as regiões CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Em uma concretização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não-humano transgênico, como por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene humano de cadeia pesada e um transgene de cadeia leve fundido com uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo recombinante humano", conforme aqui utilizado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressados, criados ou isolados através de meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (ex: um camundongo), que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado com o mesmo (descrito abaixo), (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, como por exemplo, de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de um banco de anticorpo humano combinatorial, e (d) anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados através de quaisquer outros meios que envolvem alinhamento de seqüências gênicas de imunoglobulina humana com outras seqüências de DNA. Tais anticorpos recombinantes humanos possuem regiões variáveis nas quais as regiões estruturais e CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Em certas concretizações, porém, tais anticorpos recombinantes humanos podem ser submetidos a mutagênese *in vitro* (ou quando for utilizado um animal transgênico para seqüências Ig humana, mutagênese somática *in vivo*) e

assim as seqüências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas de e relacionadas com seqüências V_H e V_L de linha germinal humana, não podem existir naturalmente no repertório de linha germinal de anticorpo humano *in vivo*. Conforme aqui utilizado, "isótipo" refere-se à classe de anticorpo (ex: IgM ou IgG1) que é codificada pelos genes da região constante de cadeia pesada.

As expressões "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são utilizadas reciprocamente na presente invenção com o termo "um anticorpo que liga-se especificamente a um antígeno".

O termo "derivados de anticorpo humano" refere-se a qualquer forma modificada do anticorpo humano, como por exemplo, um conjugado do anticorpo e outro agente ou anticorpo.

O termo "anticorpo humanizado" pretende referir-se a anticorpos nos quais as seqüências CDR derivadas da linha germinal de outra espécie mamífera, tal como um camundongo, foram enxertadas em seqüências estruturais humanas. Modificações adicionais da região estrutural podem ser feitas nas seqüências estruturais humanas.

O termo "anticorpo quimérico" pretende se referir a anticorpos nos quais as seqüências de região variável são derivadas de uma espécie e as seqüências de região constante são derivadas de outra espécie, tal como um anticorpo no qual as seqüências de região variável são derivadas de um anticorpo de camundongo e as seqüências de região constante são derivadas de um anticorpo humano.

Conforme aqui utilizado, um anticorpo que "liga-se especificamente a CD19 humano" pretende referir-se a um anticorpo que liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos, mais preferivelmente $5 \times 10^{-8}M$ ou menos, mais preferivelmente $3 \times 10^{-8}M$ ou menos, mais preferivelmente $1 \times 10^{-8}M$ ou menos, ainda mais preferivelmente $5 \times 10^{-9}M$ ou menos.

O termo " K_{assoc} " OU " K_a ", conforme aqui utilizado, pretende

se referir à taxa de associação de uma interação anticorpo-antígeno específica, ao passo que o termo " K_{dis} " ou " K_d " conforme aqui utilizado, pretende se referir à taxa de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno específica. O termo " K_D " conforme aqui utilizado, pretende se referir à constante de dissociação, que é obtida da relação de K_D para K_a (ou seja, K_D/K_a) e é expressada como uma concentração molar (M). Valores K_D para anticorpos podem ser determinados utilizando-se métodos estabelecidos no estado da técnica. Um método preferido para determinar o K_D de um anticorpo consiste em utilizar ressonância de plásmon de superfície, preferivelmente utilizar um sistema biosensor tal como um sistema Biacore®.

Conforme aqui utilizado, o termo "alta afinidade" por um anticorpo IgG refere-se a um anticorpo com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos, mais preferivelmente $5 \times 10^{-8}M$ ou menos e ainda mais preferivelmente $1 \times 10^{-9}M$ ou menos e ainda mais preferivelmente $5 \times 10^{-9}M$ ou menos, para um antígeno alvo. Porém, a ligação de "alta afinidade" pode variar para outros isótipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "alta afinidade" por um isótipo IgM refere-se a um anticorpo com um K_D de $10^{-6}M$ ou menos, mais preferivelmente $10^{-7}M$ ou menos, ainda mais preferivelmente $10^{-8}M$ ou menos.

Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" inclui qualquer animal humano ou não-humano. O termo "animal não-humano" inclui todos os vertebrados, como por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não-humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, frangos, anfíbios, répteis, etc.

Anticorpos Anti-CD19

Os anticorpos da invenção são definidos por características ou propriedades funcionais específicas dos anticorpos. Por exemplo, os anticorpos ligam-se especificamente a CD19 humano. Preferivelmente, um anticorpo da invenção liga-se a CD19 com alta afinidade,

por exemplo, com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos. Os anticorpos anti-CD19 da invenção exibem preferivelmente uma ou mais das seguintes características:

- (a) ligam-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos;
- 5 (b) ligam-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

Preferivelmente, o anticorpo liga-se a CD19 humano com um K_D de $5 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $5 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $4 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a CD19 humano com um K_D de $3 \times 10^{-9}M$ ou menos, ou liga-se a CD19 humano com um K_D de $2 \times 10^{-9}M$ ou menos, ou liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-9}M$ ou menos.

Ensaio padrão para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos a CD19 são conhecidos no estado da técnica, incluindo, por exemplo, ELISAs, Western Blots, RIAs, e análise de citometria de fluxo. Ensaio adequado são descritos detalhadamente nos Exemplos. A cinética de ligação (ex: afinidade de ligação) dos anticorpos também pode ser avaliada através de ensaios padrão conhecidos no estado da técnica, tal como através da análise por sistema Scatchard ou Biacore®. Para avaliar a ligação a células-B tumorais de Raji ou Daudi, células de Raji (Depósito ATCC No.CCL-86) ou de Daudi (Depósito ATCC No.CCL-213) podem ser obtidas de fontes publicamente disponíveis, tal como a "American Type Culture Collection", e utilizadas em ensaios padrão, tal como a análise citométrica de fluxo.

Anticorpos Monoclonais 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8.

Anticorpos preferidos da invenção são os anticorpos monoclonais humanos 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8, isolados e estruturalmente caracterizados conforme descrito nos Exemplos 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22. As seqüências de aminoácido V_H de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas nas SEQ ID NOs: 1,1,2,3,4,5,6 e 7, respectivamente. As seqüências de

aminoácido V_L de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, respectivamente.

Dado que cada um desses anticorpos pode ligar-se a CD19, as seqüências V_H e V_L podem ser "misturadas ou combinadas" para criar outras moléculas ligantes a anti-CD19 da invenção. A ligação a CD19 de tais anticorpos "misturados ou combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (ex: ELISAs). Preferivelmente, quando as cadeias V_H e V_L são misturadas e combinadas, uma seqüência V_H de um emparelhamento V_H/V_L é substituída por uma seqüência V_H de estrutura similar. Da mesma forma, preferivelmente uma seqüência V_L de um emparelhamento V_H/V_L específico é substituída por uma seqüência V_L de estrutura similar.

Conseqüentemente, num aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19, preferivelmente CD19 humano. Combinações preferidas de cadeia pesada e leve incluem:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:8; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1, e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9; ou

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2; e (b) uma região

- variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10; ou
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:3; e (b) uma região
- 5 variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:11; ou
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de
- 10 aminoácido de SEQ ID NO:12; ou
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13; ou
- 15 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6 e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:14; ou
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a
- 20 seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15.
- Em outro aspecto, a invenção provê anticorpos que compreendem a cadeia pesada e a cadeia leve CDR1s, CDR2s
- 25 e CDR3s de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8, ou suas combinações. As seqüências de aminoácido de CDR1s V_H de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas em SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22. As seqüências de aminoácido de CDR2s V_H de 21D4,
- 30 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas nas SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29. As seqüências de aminoácido de CDR3s V_H de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas em SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36. As seqüências de
- 35 aminoácido de CDR1s V_k de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas em SEQ ID NOs: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43. As seqüências de aminoácido de CDR2s V_k

de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas em SEQ ID NOs: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50. As seqüências de aminoácido das CDR3s V_k de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas em SEQ ID NOs: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58. As regiões CDR são delineadas utilizando o sistema Kabat (Kabat, E.A., et al(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242).

10 Dado que cada um desses anticorpos podem ligar-se a CD19 e que a especificidade de ligação a antígeno é provida principalmente pelas regiões CDR1, CDR2 e CDR3, as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_H e as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_k podem ser "misturadas e combinadas" (ou
15 seja, as CDRs de anticorpos diferentes podem ser misturadas e combinadas, embora cada anticorpo deva conter uma CDR1, CDR2 e CDR3 V_H e uma CDR1, CDR2 e CDR3 V_k) para criar outras moléculas ligantes ao anti-CD19 da invenção. A ligação a CD19 de tais anticorpos "misturados
20 e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (ex: ELISAs, análise Biacore®). Preferivelmente, quando as seqüências CDR V_H são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_H específica é
25 substituída por uma seqüência(s) CDR de estrutura similar. Da mesma forma, quando seqüências CDR V_k são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_k específica é preferivelmente substituída por uma seqüência (s) CDR de estrutura
30 similar. Será evidente para o habilitado na técnica que seqüências V_H e V_L novas podem ser criadas substituindo-se uma ou mais seqüências da região CDR V_H e/ou V_L por seqüências de estrutura similar das seqüências CDR aqui descritas para os anticorpos monoclonais 21D4, 21D4a,
35 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção ligante ao

antígeno do mesmo, compreendendo:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22;
- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29;
- (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36;
- (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43;
- (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 44, 45, 46, 47, 48, 49, e 50; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19, preferivelmente CD19 humano.

Numa concretização preferida, o anticorpo compreende:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 16;
- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 23;
- (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 30;
- (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 37;
- (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 44; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 51.

Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

5 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 16;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 23;

10 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 30;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 37;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 44; e

15 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 52.

Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 17;

20 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 24;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 31;

25 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 38;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 45; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 53.

30 Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 18,

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 25;

35 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 32;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 39;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 46; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
5 compreendendo SEQ ID NO: 54.

Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 19;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
10 compreendendo SEQ ID NO: 26;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 33;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 40;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
15 compreendendo SEQ ID NO: 47; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 55.

Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

20 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 20;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 27;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
25 compreendendo SEQ ID NO: 34;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 41;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 48; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
30 compreendendo SEQ ID NO: 56.

Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 21;

35 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 28;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 35;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 42;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
5 compreendendo SEQ ID NO: 49; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 57.

Em outra concretização preferida, o anticorpo compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
10 compreendendo SEQ ID NO: 22;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 29;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 36;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
15 compreendendo SEQ ID NO: 43;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 50; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
20 compreendendo SEQ ID NO: 58.

É bastante conhecido no estado da técnica que o domínio CDR3, independentemente do(s) domínio(s) CDR1 e/ou CDR2, isoladamente pode determinar a especificidade de ligação de um anticorpo por um antígeno cognato e que anticorpos
25 múltiplos podem previsivelmente ser gerados tendo a mesma especificidade de ligação baseada numa seqüência CDR3 comum. Vide, por exemplo, Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000) (descrevendo a produção de um anticorpo anti-CD30 humanizado utilizando apenas o
30 domínio variável de cadeia pesada CDR3 de anticorpo anti-CD30 murino Ki-4); Beiboer et al., J.Mol.Biol. 296:833-849 (2000) (descrevendo anticorpos de glicoproteína-2 epitelial recombinante (EGP-2) utilizando apenas a seqüência CDR3 de cadeia pesada do anticorpo anti-EGP-2
35 MOC-31 murino parental); Rader et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 95:8910-8915 (1998) (descrevendo um painel de anticorpos $\alpha\beta 3$ anti-integrina humanizados

utilizando um domínio CDR3 variável de cadeia leve e pesada de um anticorpo LM609 $\alpha\beta$ anti-integrina murino, sendo que cada anticorpo membro compreende uma seqüência distinta fora do domínio CDR3 e capaz de ligar o mesmo

5 epítopo como o anticorpo murino parental com afinidades tão altas ou mais altas que o anticorpo murino parental); Barbas et al., J.Am.Chem.Soc. 116:2161-2162 (1994) (revelando que o domínio CDR3 provê a contribuição mais significativa para ligação ao antígeno); Barbas et al.,

10 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92:2529-2533 (1995) (descrevendo o enxerto de seqüências CDR3 de cadeia pesada de três Fabs (SI-1, SI-40 e SI-32) contra DNA placentário humano sobre a cadeia pesada de um Fab toxóide anti-tetânico, substituindo assim a CDR3 de

15 cadeia pesada existente e demonstrando que o domínio CDR3 isoladamente conferiu a especificidade de ligação); e Ditzel et al., J.Immunol., 157:739-749 (1996) (descrevendo estudos de enxerto em que a transferência apenas de CDR3 de cadeia pesada de um Fab LNA3

20 poliespecífico parental para uma cadeia pesada de um anticorpo Fab p313 ligante ao toxóide tetânico IgG monoespecífico foi suficiente para reter a especificidade de ligação do Fab parental). Cada uma dessas referências é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

25 Conseqüentemente, a presente invenção provê anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo derivado de um animal humano ou não-humano, sendo que o anticorpo monoclonal é capaz de ligar-se especificamente a CD19. Em

30 certos aspectos, a presente invenção provê anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não-humano, tal como um anticorpo de camundongo ou de rato, sendo que o anticorpo monoclonal é capaz de ligar-se especificamente

35 a CD19. Em algumas concretizações, tais anticorpos inventivos compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não-humano (a)

são capazes de competir para ligação com; (b) mantém as características funcionais; (c) ligam-se ao mesmo epítopo; e/ou (d) possuem uma afinidade de ligação similar à do anticorpo parental não-humano correspondente.

Em outros aspectos, a presente invenção provê anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo humano, tal como, por exemplo, um anticorpo humano obtido de um animal não-humano, sendo que o anticorpo humano é capaz de ligar-se especificamente a CD19. Em outros aspectos, a presente invenção provê anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou de cadeia leve de um primeiro anticorpo humano, tal como, por exemplo, um anticorpo humano obtido de um animal não-humano, sendo que o primeiro anticorpo humano é capaz de ligar-se especificamente a CD19 e sendo que o domínio CDR3 do primeiro anticorpo humano substitui um domínio CDR3 num anticorpo humano no qual falta especificidade de ligação para CD19 para gerar um segundo anticorpo humano que seja capaz de ligar-se especificamente a CD19. Em algumas concretizações, tais anticorpos inventivos compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve do primeiro anticorpo humano (a) são capazes de competir para ligar-se com; (b) mantém as características funcionais; (c) ligam-se ao mesmo epítopo; e/ou (d) possuem uma afinidade de ligação similar à do primeiro anticorpo humano parental correspondente.

Anticorpos com Sequências de Linha Germinal Específicas

Em certas concretizações, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene de imunoglobulina de cadeia pesada de linha germinal específico e/ou uma região variável de cadeia leve de um gene de imunoglobulina de cadeia leve de linha germinal específico.

Por exemplo, numa concretização preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção

ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 5-51 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. Em outra concretização preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-69 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L18 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. Em outra concretização preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K A27 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L15, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo:

- (a) compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 5-51 ou 1-69 humano (cujos genes codificam as seqüências de aminoácido estabelecidas nas SEQ ID NOs: 74 e 75, respectivamente);
- (b) compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L18, V_K A27 ou V_K L15 (cujos genes codificam as seqüências de aminoácido estabelecidas nas SEQ ID NOs: 76, 77 e 78, respectivamente); e
- (c) liga-se especificamente a CD19, preferivelmente a

CD19 humano.

Exemplos de anticorpos tendo V_H e V_K de V_H 5-51 e V_K L18, respectivamente, são 21D4, 21D4a, 27F3, 5G7, 13F1 e 46E8. Um exemplo de anticorpo tendo V_H e V_K de V_H 1-69 e V_K A27, respectivamente, é o 47G4. Um exemplo de um anticorpo tendo V_K de V_H de V_H 1-69 e V_K L15, respectivamente, é o 3C10.

Conforme aqui utilizado, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de linha germinal específica se as regiões variáveis do anticorpo forem obtidas de um sistema que utiliza genes de imunoglobulina de linha germinal humana. Tais sistemas incluem imunizar um camundongo transgênico portando genes de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou identificar um banco de gene de imunoglobulina humana exibido no fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de imunoglobulina de linha germinal humana pode ser identificado como tal comparando-se a seqüência de aminoácido do anticorpo humano com as seqüências de aminoácido de imunoglobulinas de linha germinal humanas e selecionando-se a seqüência de imunoglobulina de linha germinal humana que está mais próxima em seqüência (ou seja, com a maior % de identidade) da seqüência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de imunoglobulina de linha germinal humana específica pode conter diferenças de aminoácido se comparada com a seqüência de linha germinal, devido, por exemplo, a mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação sítio-dirigida. Porém, um anticorpo humano selecionado é tipicamente pelo menos 90% idêntico em seqüência de aminoácidos a uma seqüência de aminoácido codificada por um gene de imunoglobulina de linha germinal humana e contém resíduos aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as

seqüências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinal de outras espécies (ex: seqüências de linha germinal murina). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95%, ou ainda pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntico em seqüência de aminoácido à seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma seqüência de linha germinal humana específica exibirá não mais que 10 diferenças de aminoácido das seqüências de aminoácido codificadas pelo gene de imunoglobulina de linha germinal humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode exibir não mais que 5, ou ainda não mais que 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal.

Anticorpos Homólogos

Em outra concretização ainda, um anticorpo da invenção compreende regiões variáveis de cadeia pesada e leve compreendendo seqüências de aminoácido que são homólogas às seqüências de aminoácido dos anticorpos preferidos aqui descritos, e sendo que os anticorpos mantêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-CD19 da invenção.

Por exemplo, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, sendo que:

(a) a região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7;

(b) a região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo

consistindo de SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15;

(c) o anticorpo liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos;

(d) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

Em diversas concretizações, o anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, ou um anticorpo quimérico.

5 Em outras concretizações, as seqüências de aminoácido V_H e/ou V_L podem ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogas às seqüências acima citadas. Um anticorpo tendo regiões V_H e V_L com alta homologia (ou seja, de 80% ou mais) com as regiões V_H e V_L das seqüências acima
10 citadas, pode ser obtido através de mutagênese (ou seja, mutagênese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico codificando SEQ ID NOs: 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73, seguido de teste do anticorpo codificado alterado quanto
15 à função retida (ou seja, as funções citadas de (c) a (d) acima) utilizando os ensaios funcionais aqui descritos. Conforme aqui utilizada, a homologia percentual entre as seqüências de aminoácido é equivalente à identidade percentual entre as duas seqüências. A identidade
20 percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (ou seja, % homologia = # de posições idênticas/total de # de posições x 100), levando em consideração o número de espaços ("gaps") e a extensão de
25 cada espaço, que precisam ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas seqüências. A comparação de seqüências e a determinação da identidade percentual entre as duas seqüências pode ser realizada utilizando-se um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos
30 não restritivos abaixo.

A identidade percentual entre as duas seqüências de aminoácido pode ser determinada utilizando-se o algoritmo de E.Meyers e W.Miller (Comput. Appl.Biosci.4:11-17(1988)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão
35 2.0) utilizando a tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de extensão de espaço de 12 e uma penalidade por inserção de espaço de 4. Além disso, a identidade

percentual entre as duas seqüências de aminoácido pode ser determinada utilizando-se o algoritmo de Needleman e Wunsch (J.Mol.Biol.48:444-453 (1970)) que foi incorporado ao programa GAP no pacote de software CGC (disponível em
5 www.gcg.com), utilizando ou uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso de espaço de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de extensão de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Adicionalmente ou alternativamente, as seqüências de proteína da presente invenção podem ser ainda utilizadas
10 como "seqüência de pesquisa/consulta ("query")" para busca em bancos de dados públicos para, por exemplo, identificar seqüências relacionadas. Tais buscas podem ser efetuadas utilizando-se o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al.(1990) J.Mol.Biol.215:403-10. As
15 buscas BLAST de proteína podem ser efetuadas com o programa XBLAST, *escore*=50, *extensão de palavra*=3 para obter seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de anticorpo da invenção. Para obter alinhamentos com espaço para fins de comparação, o "Gapped BLAST" pode ser
20 utilizado conforme descrito em Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e "Gapped BLAST", podem ser utilizados os parâmetros de valor padrão dos respectivos programas (ex: XBLAST e NBLAST). Vide www.ncbi.nlm.nih.gov.
25 Anticorpos com Modificações Conservativas
Em certas concretizações, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências CDR1,
30 CDR2 e CDR3, sendo que uma ou mais dessas seqüências CDR compreendem seqüências de aminoácido especificadas com base nos anticorpos preferidos aqui descritos (ex: 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8), ou suas modificações conservativas, e sendo que os anticorpos
35 mantém as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-CD19 da invenção. Conseqüentemente, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma

porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

- 5 (a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36, e suas modificações conservativas;
 - 10 (b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüência de aminoácido de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58 e suas modificações conservativas;
 - 15 (c) o anticorpo liga-se a C D19 humano com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos;
 - (d) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.
- Numa concretização preferida, a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de
- 20 aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 26, 27, 28, e 29 e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de
 - 25 seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50 e suas modificações conservativas. Em outra concretização preferida, a seqüência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências
 - 30 de aminoácido de SEQ ID NOS: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 37, 38, 39, 40,
 - 35 41, 42 e 43, e suas modificações conservativas.

Em diversas concretizações, o anticorpo pode ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou

anticorpos quiméricos.

Conforme aqui utilizado, o termo "modificações conservativas de seqüência" pretende se referir a modificações de aminoácido que não afetam nem alteram significativamente as características de ligação do anticorpo contendo a seqüência de aminoácido. Tais modificações conservativas incluem substituições, adições e deleções de aminoácido. As modificações podem ser introduzidas num anticorpo da invenção através de técnicas padrão conhecidas no estado da técnica, tais como mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR. Substituições conservativas de aminoácido são aquelas em que o resíduo aminoácido é substituído por um resíduo aminoácido que possui uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos aminoácido com cadeias laterais similares foram definidas no estado da técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (ex: lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (ex: ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (ex: glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não-polares (ex: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais com ramificação beta (ex: treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (ex: tirosina, fenilalanina, triptofato, histidina). Assim, um ou mais resíduos aminoácido dentro das regiões CDR de um anticorpo da invenção podem ser substituídos por outros resíduos aminoácido da mesma família de cadeia lateral e o anticorpo alterado pode ser testado quanto à função retida (ou seja, a função estabelecida de (c) a (d) acima) utilizando os ensaios funcionais aqui descritos.

Anticorpos que Ligam-se ao mesmo Epítopo como Anticorpos Anti-CD19 da Invenção

Em outra concretização, a invenção provê anticorpos que ligam-se ao mesmo epítopo em CD19 humano como qualquer um

dos anticorpos monoclonais CD19 da invenção (ou seja, anticorpos que possuem a capacidade de fazer competição cruzada para ligar-se a CD19 com qualquer um dos anticorpos monoclonais da invenção). Em concretizações preferidas, o anticorpo de referência para estudos de competição cruzada pode ser o anticorpo monoclonal 21D4 tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1 e 8, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 21D4a (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1 e 9, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 47G4 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2 e 10, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 27F3 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 3 e 11 respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 3C10 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 4 e 12, respectivamente) ou o anticorpo monoclonal 5G7 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 5 e 13, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 13F1 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 6 e 14, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 46E8 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 7 e 15, respectivamente). Tais anticorpos de competição cruzada podem ser identificados com base em sua capacidade de fazer competição cruzada com 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8, nos ensaios padrão de ligação a CD19. Por exemplo, a análise BIAcore®, ensaios ELISA ou a citometria de fluxo podem ser usados para demonstrar a competição cruzada com os anticorpos da presente invenção. A capacidade de um anticorpo de teste inibir a ligação, por exemplo, de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8 a CD19 humano demonstra que o anticorpo de teste pode competir com 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8 para ligar-se a CD19 humano e assim liga-se ao mesmo epítopo em CD19 humano como 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8. Numa concretização preferida, o anticorpo

que se liga ao mesmo epítopo em CD19 humano como 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8 é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados conforme descrito nos

5 Exemplos.

Anticorpos Construídos e Modificados

Um anticorpo que possui uma ou mais das seqüências V_H e V_L aqui descritas pode ser usado como material de partida para construir um anticorpo modificado que pode ter

10 propriedades alteradas se comparado com o anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser construído através da modificação de um ou mais aminoácidos dentro de uma ou de ambas as regiões (ou seja, V_H e/ou V_L), por exemplo, dentro de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de uma ou

15 mais regiões estruturais. Adicionalmente, ou alternativamente, um anticorpo pode ser construído através da modificação de resíduos dentro da região(s) constante(s), por exemplo, para alterar a função(ões) efectoras do anticorpo.

20 Em certas concretizações, o enxerto em CDR pode ser usado para construir regiões variáveis de anticorpos. Os anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos aminoácido que estão localizados nas seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de

25 cadeia pesada e leve. Por essa razão, as seqüências de aminoácido dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que as seqüências fora das CDRs. Uma vez que as seqüências de CDR são responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é

30 possível expressar anticorpos recombinantes que imitem as propriedades de anticorpos específicos de ocorrência natural construindo-se vetores de expressão que incluam seqüências CDR do anticorpo específico de ocorrência natural enxertado nas seqüências estruturais de um

35 anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen,

C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Patente americana 5.225.539 a Winter, e patentes americanas Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 a Queen et al.).

5 Conseqüentemente, outra concretização refere-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou a uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que compreende seqüências CDR1, CDR2, e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácido
 10 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29 e SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36, respectivamente, e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo
 15 uma seqüência de aminoácido do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, SEQ ID NOs: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50 e SEQ ID NOs: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58, respectivamente. Assim, tais anticorpos contêm as seqüências CDR V_H e V_L de anticorpos monoclonais 21D4,
 20 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou 46E8 e ainda podem conter seqüências estruturais diferentes desses anticorpos.

Tais seqüências estruturais podem ser obtidas de bancos de dados públicos de DNA ou de referências publicadas que
 25 incluam seqüências gênicas de anticorpo na linha germinal. Por exemplo, as seqüências de DNA na linha germinal para genes humanos da região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas no banco de dados de seqüência de linha germinal humana "VBase" (disponível na
 30 internet no www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), bem como em Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human
 35 Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox, J.P.L. et al. (1994) "A

Directory of Human Germ-line V_H segments Reveals a Strong Bias in Their Usage" Eur.J.Immunol.24:827-836; cujo conteúdo de cada um foi aqui expressamente incorporado por referência. Como outro exemplo, as seqüências de DNA da linha germinal para genes humanos da região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas no banco de dados Genbank. Por exemplo, as seqüências da linha germinal de cadeia pesada a seguir descritas, encontradas no camundongo HCo7 HuMAb estão disponíveis nos números de registro do Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 e BC070333), 3-33 (NG_0010109 e NT_024637) e 3-7 (NH_0010109 e NT_024637). Como outro exemplo, as seqüências da linha germinal de cadeia pesada a seguir descritas, encontradas no camundongo HCo12 HuMAb estão disponíveis nos números de registro do Genbank: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 e BC070333), 5-51 (NG_0010109 e NT_024637), 4-34 (NG_0010109 e NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) e 3-23 (AJ406678).

As seqüências de proteína de anticorpo são comparadas contra um banco de dados compilado de seqüência de proteínas utilizando um dos métodos de busca por similaridade de seqüência denominado Gapped BLAST (Altschul et al.(1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402) que é bastante conhecido no estado da técnica. BLAST é um algoritmo heurístico em que um alinhamento estatisticamente significativo entre a seqüência do anticorpo e a seqüência do banco de dados provavelmente contém pares de segmentos de alta classificação (HSP) de palavras alinhadas. Os pares de segmentos cujas classificações não podem ser melhoradas por extensão ou adaptação são denominados "hit" (resultado). Resumidamente, as seqüências de nucleotídeos de origem VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) são traduzidas e a região entre e incluindo a região estrutural de FR1 a FR3 fica retida. As seqüências de banco de dados possuem uma extensão média de 98 resíduos. Seqüências em duplicata que são combinações exatas por

toda a extensão da proteína são removidas. Uma busca BLAST por proteínas utilizando o programa blastp com valor padrão, parâmetros padrão com exceção do filtro de baixa complexidade que é desativado, e a matriz de substituição de BLOSUM62, filtra as combinações de seqüência produzindo os 5 primeiros resultados ("hits"). As seqüências de nucleotídeo são traduzidas em todas as seis estruturas e a estrutura sem códons de parada no segmento combinante da seqüência do banco de dados é considerada o resultado ("hit") em potencial. Isso é confirmado utilizando o programa tblastx BLAST que traduz a seqüência de anticorpo em todas as seis estruturas e compara essas traduções com as seqüências de nucleotídeos VBASE dinamicamente traduzidas em todas as seis estruturas.

As identidades são pares exatos de aminoácido entre a seqüência de anticorpo e o banco de dados de proteínas por toda a extensão da seqüência. Os positivos (identidades + par de substituição) não são idênticos mas substituições de aminoácido orientadas pela matriz de substituição BLOSUM62. Se a seqüência de anticorpo combinar duas seqüências do banco de dados com a mesma identidade, o resultado com mais positivos seria decidido como o resultado de seqüência combinante.

Seqüências estruturais preferidas para uso nos anticorpos da invenção são estruturalmente similares às seqüências estruturais utilizadas por anticorpos selecionados da invenção, como por exemplo, similares às seqüências estruturais V_H 5-51 (SEQ ID NO:74) e/ou as seqüências estruturais V_H 1-69 (SEQ ID NO:75) e/ou as seqüências estruturais V_K L18 (SEQ ID NO:76) e/ou a seqüência estrutural V_K A27 (SEQ ID NO:77) e/ou a seqüência estrutural V_K L15 (SEQ ID NO:78) utilizadas por anticorpos monoclonais preferidos da invenção. As seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_H e as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_K podem ser enxertadas em regiões estruturais que possuam a seqüência idêntica à encontrada

no gene de imunoglobulina de linha germinal do qual deriva a seqüência estrutural, ou as seqüências de CDR podem ser enxertadas em regiões estruturais que contenham uma ou mais mutações se comparadas com as seqüências de
5 linha germinal. Por exemplo, descobriu-se que em certos casos, é benéfico mutar resíduos dentro das regiões estruturais para manter ou aumentar a capacidade de ligação do anticorpo ao antígeno (vide, por exemplo, as patentes americanas 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e
10 6.180.370 de Queen et al).

Outro tipo de modificação na região variável consiste em mutar resíduos aminoácido dentro das regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 V_H e/ou V_K para assim melhorar uma ou mais das propriedades de ligação (ex: afinidade) do anticorpo de
15 interesse. A mutagênese sítio-dirigida ou a mutagênese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a(s) mutação(ões) e o efeito sobre a ligação do anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliado em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, conforme aqui
20 descrito e fornecido nos Exemplos. São introduzidas modificações conservativas preferidas (conforme discutido acima). As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácido, porém, são preferivelmente substituições. Além disso, tipicamente não são alterados
25 mais que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos numa região CDR.

Conseqüentemente, em outra concretização, a presente descrição provê anticorpos monoclonais anti-CD19 isolados, ou porções ligantes ao antígeno dos mesmos,
30 compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo: (a) uma região CDR1 V_H compreendendo uma seqüência de aminoácido do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco
35 substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com as SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22; (b) uma região CDR2 V_H compreendendo uma seqüência de

aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com as SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29;

5 (c) uma região CDR3 V_H compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido se comparada com SEQ ID NOS: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36;

10 (d) uma região CDR1 V_K compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido se comparada com SEQ ID NOS: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43;

15 (e) uma região CDR2 V_K compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com SEQ ID NOS: 44, 45, 46, 47, 48, 49, e 50; e

20 (f) uma região CDR3 V_K compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58, ou uma sequência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e

25 58.

30

Anticorpos construídos da invenção incluem aqueles cujas modificações foram efetuadas em resíduos estruturais em V_H e/ou V_K , como por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente, tais modificações

35 estruturais são feitas para reduzir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, um método consiste em fazer retro-mutação ("backmutate") em um ou mais resíduos

estruturais para a sequência de linha germinal correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que tiver sido submetido à mutação somática poderá conter resíduos estruturais que diferem da sequência da linha germinal da qual deriva o anticorpo. Tais resíduos podem ser identificados comparando-se as sequências estruturais do anticorpo com as sequências de linha germinal da qual deriva o anticorpo.

Por exemplo, a Tabela 1 abaixo mostra diversas alterações de aminoácido dentro das regiões estruturais dos anticorpos anti-PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 que diferem da sequência de linha germinal parental de cadeia pesada. Para retornar um ou mais dos resíduos aminoácido nas sequências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, as mutações somáticas podem ser retro-mutadas ("backmutated") para a sequência de linha germinal, por exemplo, através de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR.

Tabela 1 - Modificações nos anticorpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 da configuração de linha germinal de cadeia pesada

Anti-CVD19 Ab	Posição do aminoácido	Aminoácido de anticorpo	Aminoácido original de configuração de linha germinal
21D4	30	S	T
	77	R	S
21D4a	30	S	T
	77	R	S
47G4	24	D	A
3C10	77	N	S
	88	A	S
5G7	19	N	K
	77	N	S
13F1	19	Q	K
	28	T	S
	85	G	S
46E8	19	Q	K
	28	T	S
	85	G	S

Outro tipo de modificação estrutural envolve mutar um ou

mais resíduos dentro da região estrutural ou ainda dentro de uma ou mais regiões CDR, para remover os epítomos de célula T para assim reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Esse método é também designado como
5 "desimunização" e é descrito em maiores detalhes na patente americana No. 20030153043 de Carr et al.

Além de e como alternativa às modificações feitas dentro das regiões estruturais ou CDR, os anticorpos da invenção podem ser construídos para incluir modificações na região
10 Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades estruturais do anticorpo, tal como meia vida sérica, fixação de complemento, ligação a receptor Fc, e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente
15 modificado (ex: uma ou mais porções químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou modificado para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma dessas concretizações é descrita em maiores detalhes abaixo. A
20 numeração dos resíduos na região Fc é a do índice EU de Kabat.

Numa concretização, a região de dobra de CH1 é modificada de forma tal que o número de resíduos cisteína na região de dobra é alterado, como por exemplo, aumentado ou
25 reduzido. Esse método é descrito mais detalhadamente na patente americana No. 5.677.425 de Bodmer et al. O número de resíduos cisteína na região de dobra de CH1 é alterado, por exemplo, para facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas ou para aumentar ou diminuir a
30 estabilidade do anticorpo.

Em outra concretização, a região de dobra Fc de um anticorpo é mutada para reduzir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região interfacial de
35 domínio CH2-CH3 do fragmento de dobra Fc até que o anticorpo tenha danificado a ligação a proteína A estafilocócica (SpA) em relação à ligação a SpA de

domínio de dobra Fc nativo. Esse método é descrito mais detalhadamente na patente americana No. 6.165.745 de Ward et al.

Em outra concretização, o anticorpo é modificado para
5 aumentar sua meia-vida biológica. Diversos métodos são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, conforme descrito na patente americana No. 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar a meia-vida
10 biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou C_L para conter um epítipo ligante ao receptor de resgate tomado de dois laços de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nas patentes americanas Nos. 5.869.046 e 6.121.022, de Presta et al.

15 Em outras concretizações ainda, a região Fc é alterada substituindo-se pelo menos um resíduo aminoácido por um resíduo aminoácido diferente para alterar a(s) função(ões) efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionado de resíduos aminoácido 234,
20 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 podem ser substituídos por um resíduo aminoácido diferente, de forma que o anticorpo tenha uma afinidade alterada por um ligante efetor, mas que mantenha a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo parental. O ligante efetor no qual
25 a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente de complemento C1. Esse método é descrito com maiores detalhes nas patentes americanas Nos. 5.624.821 e 5.648.260, ambas de Winter et al.

Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionado de
30 resíduos aminoácido 329, 331 e 322 podem ser substituídos por um resíduo aminoácido diferente, de forma que o anticorpo altere a ligação a C1q e/ou reduza ou anule a citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Esse método é descrito com maiores detalhes na patente
35 americana No. 6.194.551 de Idusogie et al.

Em outro exemplo, um ou mais resíduos aminoácido nas posições de aminoácido 2316, 17, 18, 19, 20, 21 e 2239

são alterados para assim alterar a capacidade de o anticorpo fixar o complemento. Esse método é descrito na publicação PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

Em outro exemplo ainda, a região Fc é modificada para
5 aumentar a capacidade de o anticorpo mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo por um receptor Fcγ modificando um ou mais aminoácidos nas seguintes posições: 238, 239, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265,
10 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437,
15 438 ou 439. Esse método é descrito mais detalhadamente na Publicação PCT WO 00/42072 de Presta. Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e as variantes com ligação melhorada foram descritas (vide Shields, R.L. et al. (2001)
20 J. Biol. Chem 276:6591-6604). Mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 demonstraram melhorar a ligação a FcγRIII. Além disso, os seguintes mutantes de combinação demonstraram melhorar a ligação a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e
25 S298A/E333A/K334A.

Em outra concretização, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, pode-se preparar um anticorpo aglicosilado (ou seja, o anticorpo carece de glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por
30 exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo pelo antígeno. Tais modificações em carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando-se um ou mais sítios de glicosilação na sequência do anticorpo. Por exemplo, podem ser feitas uma ou mais substituições de aminoácido
35 que resultem em eliminação de um ou mais sítios de glicosilação na estrutura da região variável para assim eliminar a glicosilação naquele sítio. Essa aglicosilação

pode aumentar a afinidade do anticorpo pelo antígeno. Tal método é descrito mais detalhadamente nas patentes americanas Nos. 5.714.350 e 6.350.861 de Co et al.

Adicionalmente ou alternativamente, pode-se preparar um anticorpo que tenha um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos fucosila ou um anticorpo com estruturas GlcNac bisegmentantes aumentadas. Tais padrões de glicosilação alterada demonstraram aumentar a capacidade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser efetuadas, por exemplo, expressando-se o anticorpo numa célula hospedeira com maquinário de glicosilação alterada. As células com maquinário de glicosilação alterada foram descritas no estado da técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais são expressados os anticorpos recombinantes da invenção, para assim produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhagens celulares Ms704, Ms705 e Ms709 carecem de gene de fucosiltransferase, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferase), de forma que os anticorpos expressados nas linhagens celulares Ms704, Ms705, e Ms709 carecem de fucose em seus carboidratos. As linhagens celulares FUT8+ Ms704, Ms705, e Ms709 foram criadas pela interrupção direcionada do gene FUT8 em células CHO/DG44 utilizando dois vetores de substituição (vide Publicação de patente americana No. 20040110704 de Yamana et al e Yamame-Ohnuki et al (2004) Biotechnol Bioeng. 87:614-22). Outro exemplo, EP 1.176.195 de Hanai et al. descreve uma linhagem celular com um gene FUT8 funcionalmente rompido, que codifica uma fucosil transferase, de forma que os anticorpos expressados em tal linhagem celular exibem hipofucosilação mediante redução ou eliminação da enzima relacionada à ligação alfa 1,6. Hanai et al também descrevem as linhagens celulares que possuem baixa atividade enzimática para adicionar fucose à N-acetilglucosamina que liga-se à região Fc do anticorpo ou

que não possuem atividade enzimática, por exemplo a linhagem celular de mieloma de rato YB2/0 (ATCC CRL 1662). A Publicação PCT WO 03/035835 de Presta descreve uma linhagem celular CHO variante, células Lec13, com

5 capacidade reduzida de ligar fucose a carboidratos ligados a Asn(297), o que também resulta em hipofucosilação de anticorpos expressados naquela célula hospedeira (vide também Shields, R.L. et al(2002) J.Biol.Chem. 277:26733-26740). A publicação PCT WO

10 99/54342 de Umana et al., descreve linhagens celulares construídas para expressar glicosil transferases modificadoras de glicoproteína (ex: beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII) de forma que os anticorpos expressados nas linhagens celulares

15 construídas exibam estruturas GlcNac bisegmentantes aumentadas, o que resulta em atividade aumentada de ADCC dos anticorpos (vide também Umana et al.(1999) Nat. Biotech. 17:176-180). Alternativamente, os resíduos fucose do anticorpo podem ser clivados utilizando-se uma

20 enzima fucosidase. Por exemplo, a fucosidase alfa-L-fucosidase remove resíduos fucosila de anticorpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Outra modificação dos anticorpos prevista na presente invenção é a peg-glicosilação ("pegylation"). Um

25 anticorpo pode ser submetido à peg-glicosilação para, por exemplo, aumentar a meia-vida biológica (ex: sérica) do anticorpo. Para tratar o anticorpo com peg-glicosilação, o anticorpo ou o fragmento, é tipicamente reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou

30 derivado de aldeído de PEG, sob condições nas quais um ou mais grupos PEG ficam ligados ao anticorpo ou ao fragmento de anticorpo. Preferivelmente, a peg-glicosilação é conduzida via reação de acilação ou reação de alquilação com uma molécula de PEG reativo(ou um

35 polímero reativo análogo solúvel em água). Conforme aqui utilizado, o termo "polietileno glicol" pretende abranger qualquer uma das formas de PEG que tenha sido utilizada

para derivatizar outras proteínas, tais como mono(C1-C10)alcoxi- ou ariloxi-poli-etileno glicol ou poli-etileno-glicol-maleimida. Em certas concretizações, o anticorpo a ser tratado com PEG é um anticorpo aglicosilado. Métodos para tratar proteínas com PEG-glicosilação são conhecidos no estado da técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide, por exemplo, EP 0 154 316 de Nishimura et al. e EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Propriedades Físicas do Anticorpo

- 10 Os anticorpos da presente invenção podem ser ainda caracterizados pelas várias propriedades físicas dos anticorpos anti-CD19. Diversos ensaios podem ser usados para detectar e/ou diferenciar diferentes classes de anticorpos com base nessas propriedades físicas.
- 15 Em algumas concretizações, os anticorpos da presente invenção podem conter um ou mais sítios de glicosilação na região variável de cadeia leve ou pesada. A presença de um ou mais sítios de glicosilação na região variável pode resultar em imunogenicidade aumentada do anticorpo ou numa alteração do pK do anticorpo devido à ligação ao antígeno alterado (Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala FA e Morrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al. (1988), J.Exp Med 168:1099-109; Spiro RG (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al.(2000) Mol Immunol. 37:697-706). Sabe-se que a glicosilação ocorre em padrões contendo uma sequência N-X-S/T. A glicosilação em região variável pode ser testada utilizando um ensaio Glycoblott que cliva o anticorpo para produzir um Fab, e
- 25 que então testa a glicosilação utilizando um ensaio que mede a oxidação de periodato e a formação de base Schiff. Alternativamente, a glicosilação em região variável pode ser testada utilizando-se cromatografia de luz Dionex (Dionex-LC) que cliva sacarídeos de um Fab em monossacarídeos e analisa o teor de sacarídeo individual.
- 30 Em alguns casos, é preferido ter um anticorpo anti-CD19 que não contenha glicosilação em região variável. Isso

pode ser obtido selecionando-se anticorpos que não contêm o padrão de glicosilação na região variável ou mutando-se resíduos dentro do padrão de glicosilação utilizando técnicas padrão conhecidas no estado da
5 técnica.

Numa concretização preferida, os anticorpos da presente invenção não contêm sítios de isomerismo de asparagina. Um efeito de desamidação ou de ácido isoaspártico pode ocorrer em seqüências N-G ou D-G, respectivamente. O
10 efeito de desamidação ou de ácido isoaspártico resulta na criação de ácido isoaspártico que reduz a estabilidade de um anticorpo, criando uma estrutura dobrada fora de um terminal carboxi de cadeia lateral ao invés de na cadeia principal. A criação de ácido isoaspártico pode ser
15 medida utilizando-se um ensaio iso-quant que utiliza uma HPLC de fase reversa para testar o ácido aspártico.

Cada anticorpo terá um ponto isoelétrico inédito (pI), mas geralmente os anticorpos enquadram-se na faixa de pH de 6 e 9,5. O pI para um anticorpo IgG1 enquadra-se
20 tipicamente na faixa de pH de 7-9,5 e o pI para um anticorpo IgG4 enquadra-se tipicamente na faixa de pH de 6-8. Os anticorpos podem ter um pI que esteja fora dessa faixa. Embora os efeitos sejam geralmente desconhecidos, existe uma especulação de que os anticorpos com um pI
25 fora da faixa normal possam apresentar alguma não-revelação e instabilidade nas condições *in vivo*. O ponto isoelétrico pode ser testado utilizando-se um ensaio de focalização isoelétrica capilar que cria um gradiente de pH e que pode utilizar focalização a laser para aumentar
30 a precisão (Janini et al.(2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al.(2001) Chromatographia 53:S75:89; Hunt et al. (1998) J.Chromatogr A 800:355-67). Em alguns casos, é preferido ter um anticorpo CD19 que contenha um valor de pI enquadrado na faixa normal. Isso pode ser obtido
35 selecionando-se anticorpos com um pI na faixa normal, ou mutando-se resíduos de superfície carregada, utilizando técnicas padrão bastante conhecidas no estado da técnica.

Cada anticorpo terá uma temperatura de fusão indicativa de estabilidade térmica (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). Uma estabilidade térmica mais alta indica maior estabilidade global do anticorpo *in vivo*. O ponto de fusão de um anticorpo pode ser medido utilizando-se técnicas tais como calorimetria diferencial exploratória (Chen et al.(2003) Pharma Res 20:1952-60; Ghirlando et al(1990) Immunol Lett 68:47-52). T_{M1} indica a temperatura de não-revelação inicial do anticorpo. T_{M2} indica a temperatura de não-revelação completa do anticorpo. Geralmente, é preferido que a T_{M1} de um anticorpo da presente invenção seja superior a 60°C, preferivelmente superior a 65°C, e ainda mais preferivelmente superior a 70°C. Alternativamente, a estabilidade térmica de um anticorpo pode ser medida utilizando-se dicroísmo circular (Murray et al.(2002) J.Chromatogra Sci 40:343-9).

Numa concretização preferida, são selecionados os anticorpos que não se degradam rapidamente. A fragmentação de um anticorpo anti-CD19 pode ser medida utilizando-se eletroforese capilar (CE) e MALDI-MS, conforme é entendido no estado da técnica (Alexander AJ e Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

Em outra concretização preferida, são selecionados os anticorpos que possuam efeitos de agregação mínimos. A agregação pode levar à ativação de uma resposta imune indesejada e/ou a propriedades farmacocinéticas alteradas ou desfavoráveis. Geralmente, são aceitáveis os anticorpos com agregação de 25% ou menos, preferivelmente 20% ou menos, ainda mais preferivelmente 15% ou menos, ainda mais preferivelmente 10% ou menos ou ainda mais preferivelmente 5% ou menos. A agregação pode ser medida através de diversas técnicas bastante conhecidas no estado da técnica, incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com coluna de exclusão por dimensão (SEC) e dispersão de luz para identificar monômeros, dímeros, trímeros ou multímeros.

Métodos para Construir Anticorpos

Conforme discutido acima, os anticorpos anti-CD19 tendo seqüências V_H e V_K aqui descritos podem ser usados para criar novos anticorpos anti-CD19 modificando-se as

5 seqüências V_H e/ou V_K , ou a(s) região(ões) constantes a elas ligadas. Assim, em outro aspecto da invenção, as características estruturais de um anticorpo anti-CD19 da invenção, por exemplo, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são usadas para criar anticorpos anti-

10 CD19 estruturalmente relacionados que retenham pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como ligação a CD19 humano. Por exemplo, uma ou mais regiões CDR de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 ou suas mutações, podem ser combinadas

15 recombinantemente com regiões estruturais conhecidas e/ou com outras CDRs para criar anticorpos anti-CD19 adicionais recombinantemente construídos da invenção, conforme discutido acima. Outros tipos de modificações incluem as descritas na seção anterior. O material de

20 partida para o método de construção é uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_K aqui providas, ou uma ou mais de suas regiões CDR. Para criar o anticorpo construído, não é necessário efetivamente preparar (ou seja, expressar como proteína) um anticorpo tendo uma ou mais das

25 seqüências V_H e/ou V_K aqui providas, ou uma ou mais de suas regiões CDR. Em vez disso, as informações contidas na(s) seqüência(s) são utilizadas como o material de partida para criar uma seqüência(s) de "segunda geração" derivada(s) da seqüência(s) original e então a

30 seqüência(s) de "segunda geração" é preparada e expressada como uma proteína.

Conseqüentemente, em outra concretização, a invenção provê um método para preparar um anticorpo anti-CD19 compreendendo:

35 (a) prover: (i) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 16,

17, 18, 19, 20, 21 e 22, uma sequência CDR2 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 26, 27, 28, e 29, e/ou uma sequência CDR3 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34 e 35; e/ou

5 (ii) uma sequência de anticorpo de região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, uma sequência CDR2 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, e/ou uma sequência CDR3 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58;

(b) alterar pelo menos um resíduo aminoácido dentro da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e/ou da sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterado; e

15 (c) expressar a sequência de anticorpo alterado como uma proteína.

Técnicas padrão de biologia molecular podem ser usadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterado.

20

Preferivelmente, o anticorpo codificado pela(s) sequência(s) de anticorpo alterado(s) é aquele que retém uma, algumas ou todas as propriedades funcionais dos anticorpos anti-CD19 aqui descritos, cujas propriedades funcionais incluem, porém não se restringem a:

25

- (i) ligar-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos;
- (ii) ligar-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas utilizando-se ensaios padrão disponíveis no estado da técnica e/ou aqui descritos, tais como os estabelecidos nos Exemplos (ex: citometria de fluxo, ensaios de ligação).

30

Em certas concretizações dos métodos para construir anticorpos da invenção, mutações podem ser introduzidas aleatória ou seletivamente ao longo de toda ou de parte de uma sequência de codificação de anticorpo anti-CD19 e

35

os anticorpos anti-CD19 modificados resultantes podem ser identificados quanto à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais conforme aqui descrito. Métodos mutacionais foram descritos no estado da técnica. Por exemplo, a publicação PCT WO 02/092780 de Short descreve métodos para criar e identificar mutações de anticorpos utilizando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação dos mesmos.

Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 de Lazar et al., descreve métodos para utilizar métodos computacionais de identificação para otimizar as propriedades físico-químicas dos anticorpos.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codificam Anticorpos

Outro aspecto da invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células completas, num lisado de células, ou numa forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando purificado à distância de outros componentes celulares ou outros contaminantes, como por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, através de técnicas padrão, incluindo o tratamento alcalino/SDS, bandeamento CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outros bastante conhecidos no estado da técnica. Vide, F.Ausubel et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Um ácido nucleico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter seqüências intrônicas. Numa concretização preferida, o ácido nucleico é uma molécula de cDNA.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos utilizando-se técnicas padrão de biologia molecular. Para anticorpos expressados por hibridomas (ex: hibridomas preparados a partir de camundongos transgênicos portando genes de imunoglobulina humana conforme descrito logo abaixo) cDNAs codificando as cadeias leve e pesada do

anticorpo produzido pelo hibridoma podem ser obtidos através de amplificação PCR padrão ou técnicas de clonagem de cDNA. Para anticorpos obtidos de um banco de gene de imunoglobulina (ex: utilizando técnicas de
5 exibição de fago), um ou mais ácidos nucleicos que codificam o anticorpo podem ser recuperados do banco.

Moléculas de ácido nucleico preferidas da invenção são as que codificam as seqüências V_H e V_L dos anticorpos monoclonais 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 ou
10 46E8. As seqüências de DNA que codificam as seqüências V_H de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 são mostradas nas SEQ ID NOS: 59, 60, 61, 62, 63, 64 e 65, respectivamente. Seqüências de DNA que codificam as seqüências V_L de 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1
15 e 46E8 são mostradas nas SEQ ID NOS: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 e 73, respectivamente.

Uma vez obtidos os fragmentos de DNA que codificam os segmentos V_H e V_L , esses fragmentos de DNA podem ser ainda manipulados através de técnicas padrão de DNA
20 recombinante, por exemplo, para converter os genes de região variável em genes de cadeia de anticorpo de extensão completa, em genes de fragmento Fab, ou num gene scFv. Nessas manipulações, um fragmento de DNA codificador de V_L ou V_H é operativamente ligado a outro
25 fragmento de DNA que codifica outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. O termo "operativamente ligado", utilizado neste contexto, pretende significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de forma tal que as seqüências de
30 aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam na estrutura ("in-frame").

O DNA isolado que codifica a região V_H pode ser convertido num gene de cadeia pesada de extensão completa ligando-se operativamente o DNA codificador de V_H em
35 outra molécula de DNA que codifica as regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências de genes humanos de região constante de cadeia pesada são

conhecidas no estado da técnica (vide, por exemplo, Kabat et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e fragmentos
 5 de DNA abrangendo essas regiões podem ser obtidos através de amplificação PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, porém, o mais preferivelmente é uma região constante IgG1 ou IgG4. Para um gene de
 10 cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA codificador de V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA que codifica apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado que codifica a região V_L pode ser
 15 convertido num gene de cadeia leve de extensão completa (bem como um gene de cadeia leve Fab) ligando-se operativamente o DNA codificador de V_L a outra molécula de DNA que codifica a região constanter de cadeia leve, CL. As seqüências de genes humanos da região constante de
 20 cadeia leve são conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, Kabat, E.A. et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e fragmentos de DNA abrangendo
 25 essas regiões podem ser obtidos através de amplificação PCR padrão. Em concretizações preferidas, a região constante de cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA que
 30 codificam V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligante flexível, como por exemplo, que codifica a seqüência de aminoácido $(Gly_4-Ser)_3$, de forma que as seqüências de V_H e V_L possam ser expressadas como uma proteína de cadeia simples contígua,
 35 com as regiões V_L e V_H unidas pelo ligante flexível (vide, por exemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; Huston et al.(1988) Proc. Natl.Acad. Sci.USA

85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Produção de Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção
5 podem ser produzidos através de uma variedade de técnicas, inclusive a metodologia convencional de anticorpo monoclonal, como por exemplo, a técnica padrão de hibridação de célula somática de Kohler e Milstein (1975) Nature 256:495. Embora os procedimentos de
10 hibridação de célula somática sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser empregadas, como por exemplo, a transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparar hibridomas é o
15 sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos e técnicas de imunização para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos no estado da técnica. Pares de fusão (ex: células de mieloma murino) e
20 procedimentos de fusão são também conhecidos.

Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na seqüência de um anticorpo monoclonal não-humano preparado conforme acima descrito. O DNA que codifica as imunoglobulinas de cadeia
25 leve e pesada pode ser obtido de um hibridoma não-humano de interesse e construído para conter seqüências de imunoglobulina não-murina (ex: humana) utilizando as técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, regiões murinas variáveis
30 podem ser ligadas a regiões humanas constantes utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, a patente americana No. 4.816.567 de Cabilly et al.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR murinas podem ser inseridas numa estrutura humana
35 utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, a patente americana No. 5.225.539 de Winter, e as patentes americanas Nos. 5.530.101;

5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen et al.).

Numa concretização preferida, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra CD19 podem ser gerados utilizando camundongos transgênicos ou transcromossômicos portando partes do sistema imune humano ao invés do sistema camundongo. Esses camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos aqui designados como HuMAb Mouse® e KM Mouse®, respectivamente, e são coletivamente designados "camundongos com Ig humana".

O HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contém miniloci ("miniloci") de gene de imunoglobulina humana que codificam seqüências de imunoglobulina humana não rearranjadas de cadeia pesada (μ e γ) e leve κ , juntamente com mutações direcionadas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógena (vide, por exemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474):856-859). Conseqüentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo e, em resposta à imunização, os transgenes humanos introduzidos de cadeia pesada e leve sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgG κ de alta afinidade (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado em Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg N. e Huszar, D. (1995) Intern.Rev.Immunol.13:65-93 e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) Ann.N.Y.Acad.Sci.764:536-546). A preparação e uso do HuMAb Mouse® bem como as modificações genômicas carregadas pelos camundongos, são ainda descritas em Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, JH. et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuailon et al. (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J.12:821-830; Tuailon et al. (1994) J.Immunol.152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6:579-591; e Fisgwild, D. et al. (1996) Nature

Biotechnology 14:845-851, cujos conteúdos foram aqui incorporados especificamente por referência em sua totalidade. Vide, ainda, as patentes americanas Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todos de Lonberg e Kay; patente americana No. 5.545.807 de Surani et al.; Publicação PCT Nos. WO 92/03918, WO93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todos de Lonberg e Kay; e Publicação PCT No. WO 01/14424 de Korman et al.

Em outra concretização, os anticorpos humanos da invenção podem ser produzidos utilizando um camundongo que carrega seqüências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomos, tal como um camundongo que carrega um transgene humano de cadeia pesada e um transcromossomo humano de cadeia leve. Tais camundongos, aqui designados camundongos "KM miceTM" são descritos detalhadamente na Publicação PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Os sistemas animais transgênicos alternativos expressando genes de imunoglobulina humana estão disponíveis no estado da técnica e podem ser usados para produzir anticorpos anti-CD19 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo designado Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos, por exemplo, nas patentes americanas Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos expressando genes de imunoglobulina humana estão disponíveis no estado da técnica e podem ser usados para produzir anticorpos anti-CD19 da invenção. Por exemplo, camundongos carregando tanto um transcromossomo humano de cadeia pesada como um transcromo humano de cadeia leve, designados como "camundongos TC" podem ser usados; tais camundongos são descritos em Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, vacas portando os transcromossomos humanos de cadeia leve

e pesada foram descritas no estado da técnica (Kuroiwa et al.(2002) Nature Biotechnology 20:889-894) e podem ser usados para produzir anticorpos anti-CD19 da invenção.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também
 5 ser preparados utilizando métodos de exibição de fago para identificar bancos de genes de imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição de fago para isolar anticorpos humanos são estabelecidos no estado da técnica. Vide, por exemplo, as patentes americanas Nos.
 10 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 de Ladner et al; Patentes americanas Nos. 5.427.908 e 5.580.717 de Dower et al.; Patentes Americanas Nos. 5.9698.108 e 6.172.197 de McCafferty et al.; e patentes americanas Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.9130,
 15 31, 32, 33, 34, 35 e 36.593.081 de Griffiths et al.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparados utilizando camundongos SCID nos quais as células imunes humanas foram reconstituídas de forma que uma resposta a anticorpo humano possa ser
 20 gerada quando da imunização. Tais camundongos são descritos, por exemplo, nas patentes americanas NOs. 5.476.996 e 5.698.767 de Wilson et al.

Imunização de Camundongos com Ig Humana

Quando camundongos com Ig humana são utilizados para
 25 produzir anticorpos humanos da invenção, tais camundongos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno CD19 e/ou CD19 recombinante, ou células expressando CD19, ou uma proteína de fusão CD19, conforme descrito por Lonberg N.et al.(1994) Nature
 30 368(6474): 856-859; Fishwild, D.et al.(1996) Nature Biotechnology 14:845-851; e publicação PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. Preferivelmente, os camundongos terão de 6-16 semanas de vida quando da primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-
 35 50µg) de antígeno CD19 pode ser utilizada para imunizar o camundongo com Ig humana intraperitonealmente.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos

monoclonais totalmente humanos para CD19 são descritos no Exemplo 1 abaixo. A experiência cumulativa com diversos antígenos tem demonstrado que os camundongos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno em adjuvante de Freund completo, seguido de imunizações IP semana sim, semana não, (até um total de 6) com antígeno em adjuvante de Freund incompleto. Porém, adjuvantes outros que não o de Freund também se mostraram eficazes. Além disso, células completas na ausência de adjuvante demonstraram ser altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorada durante o curso do protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas por sangramentos retroorbitais. O plasma pode ser identificado através de teste ELISA (conforme descrito abaixo) e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-CD19 podem ser usados para as fusões. Os camundongos podem receber antígeno intravenosamente 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Espera-se que 2-3 fusões para cada imunização precisem ser realizadas. Entre 6 e 24 camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Geralmente, são utilizadas tanto as cepas HCo7 como HCo12. Além disso, tanto o transgene HCo7 como o HCo12 podem ser produzidos juntos num único camundongo que tenha dois transgenes humanos diferentes de cadeia pesada (HCo7/HCo12). Alternativamente, ou adicionalmente, a cepa do KM Mouse® pode ser usada, conforme descrito no Exemplo 1.

30 Geração de Hibridomas que Produzem Anticorpos Monoclonais Humanos

Para gerar hibridomas que produzam os anticorpos monoclonais humanos da invenção, esplenócitos e/ou células de nódulos linfáticos de camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos a uma linhagem celular imortalizada apropriada, tal como uma linhagem celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser identificados quanto à produção de anticorpos

antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões celulares simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundidas a um sexto do número de células de mieloma de camundongo não-secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com PEG a 50%. Alternativamente, a suspensão celular simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados pode ser fundida utilizando um método de eletrofusão baseado em campo elétrico, utilizando um eletroporador para fusão de células em câmara grande CytoPulse (Cytopulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland). As células são plaqueadas a aproximadamente 2×10^5 em placa de microtitulação de fundo plano, seguido de incubação por duas semanas em meio seletivo contendo soro fetal Clone Serum a 20%, meios condicionados "653" a 18%, 5% origem (IGEN), 4mM L-glutamina, 1mM piruvato de sódio, 5mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina, e 1X HAT (Sigma; HAT é adicionado 24 horas após fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio no qual HAT é substituído por HT. As cavidades individuais podem então ser identificadas através de ELISA quanto aos anticorpos monoclonais humanos IgM e IgG. Ocorrido o crescimento extensivo do hibridoma, o meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpos podem ser replaqueados, identificados novamente, e se ainda forem positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes através de diluição limitada. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

Para purificar os anticorpos monoclonais humanos, hibridomas selecionados podem ser crescidos em frascos tipo "spinner" de dois litros para purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser

filtrados e concentrados antes da cromatografia por afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). A IgG eluída pode ser examinada através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS e a concentração pode ser determinada por OD 280 utilizando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

10 Geração de Anticorpos Monoclonais Produtores de Transfectomas

Os anticorpos da invenção podem também ser produzidos num transfectoma de célula hospedeira utilizando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção gênica conforme é conhecido no estado da técnica (ex: Morrison, S.(1985) Science 229:1202).

Por exemplo, para expressar anticorpos, ou os fragmentos de anticorpos dos mesmos, os DNAs que codificam cadeias leves e pesadas de extensão parcial ou completa, podem ser obtidos através de técnicas padrão de biologia molecular (ex: amplificação PCR ou clonagem CDNA utilizando um hibridoma que expresse o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos em vetores de expressão de forma que os genes sejam operativamente ligados às seqüências de controle transcricionais e translacionais. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" pretende significar que um gene de anticorpo é ligado num vetor de forma que as seqüências de controle transcricionais e translacionais dentro do vetor realizem sua função pretendida de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são selecionadas para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo pode ser inserido em vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os genes são

inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão através de métodos padrão (ex: ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo e vetor, ou ligação da extremidade enfraquecida ("blunt-end ligation" se nenhum sítio de restrição estiver presente). As regiões variáveis de cadeia leve e pesada dos anticorpos aqui descritos podem ser utilizadas para criar genes de anticorpo de extensão completa de qualquer isótipo de anticorpo inserindo-os em vetores de expressão já codificando regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve do isótipo desejado, de forma que o segmento V_H seja operativamente ligado ao(s) segmento(s) C_H dentro do vetor e o segmento V_K seja operativamente ligado ao segmento C_L dentro do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo sinal que facilite a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de forma que o peptídeo sinal seja ligado na estrutura ("in-frame") ao terminal amino do gene de cadeia de anticorpo. O peptídeo sinal pode ser um peptídeo sinal de imunoglobulina ou um peptídeo sinal heterólogo (ou seja, um peptídeo sinal de uma proteína não de imunoglobulina). Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam seqüências regulatórias que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. O termo "seqüência regulatória" pretende incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (ex: sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Tais seqüências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Mewthods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado pelos habilitados na técnica que o desenho do vetor de expressão, incluindo a seleção de

seqüências regulatórias, podem depender de fatores tais como a seleção da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. As seqüências regulatórias preferidas para expressão de
5 célula hospedeira de mamífero incluem os elementos virais que dirigem altos níveis de expressão de proteína em células de mamífero, tais como os promotores e/ou intensificadores derivados de citomagalovírus (CMV), Vírus Símio (SV40), adenovírus (ex: o promotor tardio
10 maior do adenovírus (AdMLP) e políoma. Alternativamente, as seqüências regulatórias não-virais podem ser usadas, tal como o promotor de ubiquitina ou promotor de β -globina. Outrossim, os elementos regulatórios compostos de seqüências de fontes diferentes, tal como o sistema
15 promotor SR α , que contém seqüências do promotor precoce SV40 e o terminal de repetição longa do vírus de leucemia de célula T humana do tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol Cell Biol. 8:466-472).

Além dos genes de cadeia de anticorpo e das seqüências
20 regulatórias, os vetores de expressão recombinante da invenção podem carregar seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (ex: origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a
25 seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todos de Axel et al.). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, tais como
30 G418, higromicina ou metotrexato, num célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis incluem o gene de dihidrofolato reductase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o neo gene (para
35 seleção de G418).

Para expressão das cadeias leve e pesada, o(s) vetor(es) de expressão que codificam as cadeias leve e pesada é

transfectado numa célula hospedeira através de técnicas padrão. As diversas formas do termo "transfecção" pretendem abranger uma ampla variedade de técnicas comumente utilizadas para a introdução de DNA exógeno dentro de uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, como por exemplo, eletroporação, precipitação cálcio-fosfato, transfecção DEAE-dextrano e similares. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, a expressão de anticorpos em células eucarióticas, e o mais preferivelmente em células hospedeiras de mamífero, é a mais preferida pois tais células eucarióticas e, em especial, células de mamífero, têm mais probabilidade do que as células procarióticas de montar e secretar um anticorpo adequadamente revelado e imunologicamente ativo. A expressão procariótica de genes de anticorpo foi reportada como ineficaz para produção de altos rendimentos de anticorpo ativo (Boss, M.A. e Wood, C.R.(1985) Immunology Today 6:12-13).

Células hospedeiras de mamífero preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células CHO dhfr-, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) Proc. Natl.Acad.Sci. USA 77:16-4220, utilizadas com um marcador selecionável DHFR, como por exemplo, conforme descrito em R.J.Kaufman e P.A.Sharp (1982) J.Mol.Biol.159:601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em especial, para uso com células de mieloma NSO, outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão gênica GS descrito em WO 87/04462 (Wilson), WO 89/01036 (a Bebbington) e EP 338.841 (Bebbington). Quando os vetores de expressão recombinante codificando genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando-se as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir expressão do

anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são crescidas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando-se métodos padrão de purificação de proteína.

Caracterização de Ligação do Anticorpo ao Antígeno

Os anticorpos da invenção podem ser testados quanto à ligação a CD19, por exemplo, através de ELISA padrão. Resumidamente, placas de microtitulação são revestidas com CD19 purificado a $0,25\mu\text{g/ml}$ em PBS, e então bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. As diluições de anticorpo (ex: diluições de plasma de camundongos CD19-imunizados) são adicionadas a cada cavidade e incubadas durante 1-2 horas a 37°C . As placas são lavadas com PBS/Tween e então incubadas com reagente secundário (ex: para anticorpos humanos, um reagente policlonal Fc-específico IgG anti-humano de cabra) conjugado a fosfatase alcalina durante 1 hora a 37°C . Após lavagem, as placas são desenvolvidas com substrato pNPP (1 mg/ml) e analisadas em OD de 405-650. Preferivelmente, os camundongos que desenvolverem as titulações mais altas serão usados nas fusões.

Um ensaio ELISA, conforme acima descrito, pode também ser usado para identificar hibridomas que mostram reatividade positiva com imunógeno CD19. Hibridomas que ligam-se com alta avidéz a CD19 são subclonados e então caracterizados. Um clone de cada hibridoma, que retém a reatividade das células parentais (através de ELISA) pode ser selecionado para preparar um banco de células de 5-10 frascos armazenado a -140°C e para purificação de anticorpo.

Para purificar anticorpos anti-CD19, hibridomas selecionados podem ser crescidos em frascos tipo "spinner" de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia Piscataway, NJ). A IgG

eluída pode ser verificada através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS e a concentração pode ser determinada por OD 280 utilizando

5 coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-CD19 selecionados ligam-se a epítomos inéditos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes disponíveis no mercado (Pierce, Rockford, IL). Os estudos de competição

10 utilizando anticorpos monoclonais não marcados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser conduzidos utilizando-se placas ELISA revestidas com CD19 conforme acima descrito. A ligação a mAb biotinilado pode ser

15 detectada com uma sonda de estreptavidina-fosfatase alcalina.

Para determinar o isótipo de anticorpos purificados, ensaios ELISA de isótipo podem ser conduzidos utilizando reagentes específicos para anticorpos de um isótipo

20 específico. Por exemplo, para determinar o isótipo de um anticorpo monoclonal humano, cavidades de placas de microtitulação podem ser revestidas com 1µg/ml de imunoglobulina anti-humana da noite para o dia a 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, as placas são reagidas com

25 1µg/ml ou menos de anticorpos monoclonais de teste ou controles de isotopos purificados, à temperatura ambiente por uma ou duas horas. As cavidades podem então ser reagidas com IgG1 humana ou sondas de conjugado de fosfatase alcalina IgM-específica humana. As placas são

30 desenvolvidas e analisadas conforme descrito acima.

IgGs anti-CD19 humanas podem ainda ser testadas quanto à reatividade com o antígeno CD19 através do método Western Blot. Resumidamente, o CD19 pode ser preparado e submetido à eletroforese em gel de dodecil sulfato de

35 sódio-poliacrilamida. Após eletroforese, os antígenos separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro fetal bovino a 10%, e

sondadas com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação a IgG humana pode ser detectada utilizando fosfatase alcalina de IgG anti-humana e desenvolvida com comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem.Cp., St.Louis, Mo).

Imunoconjugados

Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza um anticorpo anti-CD19 ou um fragmento do mesmo, conjugado a uma porção terapêutica, tal como uma citotoxina, um

10 fármaco (ex: um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são aqui designados "imunoconjugados". Os imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são designados "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja nocivo (ex: 15 que mate) às células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, 20 mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, e puromicina e seus análogos ou homólogos. Agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabólitos (ex: metotrexato, 6-mercaptopurina, 6- 25 tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes, (ex: mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina 30 platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (ex: daunorubicina (anteriormente denominada daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (ex: dactinomicina (anteriormente denominada Actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC) e agentes anti-mitóticos 35 (ex: vincristina e vinblastina).

Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugadas a um anticorpo da invenção

incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas, e seus derivados. Um exemplo de conjugado de anticorpo de caliqueamicina está disponível no mercado (Mylotarg®; American Home Products).

5 As citotoxinas podem ser conjugadas a anticorpos da invenção utilizando tecnologia de ligante disponível no estado da técnica. Exemplos de tipos de ligante que foram utilizados para conjugar uma citotoxina a um anticorpo incluem, porém não se restringem a hidrazonas, tioéteres, 10 ésteres, dissulfetos, e ligantes contendo peptídeo. Pode-se selecionar um ligante que seja, por exemplo, suscetível à clivagem por pH baixo dentro do compartimento lisossômico ou suscetível à clivagem por proteases, tais como proteases preferencialmente 15 expressadas em tecido tumoral tal como catepsinas (ex: catepsinas B, C, D).

Para mais discussão sobre os tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugar agentes terapêuticos a anticorpos, vide também Saito, G. et al.(2003) Adv Drug 20 Deliv.Rev. 55:199-215; Trail, P.A.et al.(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne G.(2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat Rev.Cancer 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R.J. (2002) Curr.Opin.Investig.Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. e 25 Springer, C.J.(2001) Adv.Drug Delivery Rev. 53:247-264.

Os anticorpos da presente invenção podem também ser conjugados a um isótopo radioativo para gerar radiofarmacêuticos, também designados radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos 30 que podem ser conjugados a anticorpos para uso diagnóstico ou terapêutico incluem, porém não se restringem a iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰ e lutécio¹⁷⁷. O método para preparar radioimunoconjugados são estabelecidos no estado da técnica. Exemplos de 35 radioimunoconjugados estão disponíveis no mercado, inclusive Zevalin®(IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar®(Corixa Pharmaceuticals) e métodos similares podem ser usados

para preparar radioimunoconjugados utilizando os anticorpos da invenção.

Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica, e a porção de fármaco não deve ser interpretada como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possua uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou um fragmento ativo da mesma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina de difteria; uma proteína tal como fator de necrose tumoral ou interferon- γ ; ou modificadores de resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônia de granulócitos ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

Técnicas para conjugar tal porção terapêutica a anticorpos são conhecidas, vide, por exemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al.(eds), pp.243-56 (Alan R.Liss, Inc.1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd.ed), Robinson et al.(eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc.1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al (eds), pp.475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al.(eds.) pp.303-16 (Academic Press 1985) e Thorpe et al., Immunol.Rev. 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza

moléculas biespecíficas compreendendo um anticorpo anti-CD19, ou um fragmento do mesmo, da invenção. Um anticorpo da invenção, ou porções ligantes ao antígeno do mesmo, pode ser derivatizado ou ligado a outra molécula funcional, como por exemplo, a outro peptídeo ou proteína (ex: outro anticorpo ou ligante para um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se ligue pelo menos a dois sítios de ligação diferentes ou moléculas alvo. O anticorpo da invenção pode, de fato, ser derivatizado ou ligado a mais de uma outra molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais de dois sítios de ligação diferentes e/ou moléculas alvo; tais moléculas multiespecíficas também pretendem ser abrangidas pelo termo "molécula biespecífica" conforme aqui utilizado. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (ex: por acoplamento químico, fusão genética, associação não-covalente ou de outra forma) a uma ou mais outras moléculas ligantes, tal como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimética de ligação, de forma a resultar numa molécula biespecífica.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação para CD19 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo. Numa concretização específica da invenção, o segundo epítipo alvo é um receptor Fc, como por exemplo, Fc γ RI humano (CD64) ou um receptor Fc α humano (CD89). Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas capazes de ligar-se a células efetoras expressando tanto Fc γ R como Fc α R (ex: monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) e a células alvo expressando CD19. Essas moléculas biespecíficas direcionam as células expressando CD19 à célula efetora e disparam atividades de célula efetora mediada por receptor Fc, tal como a fagocitose de células expressando CD19, citotoxicidade

mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocinas, ou geração de ânion superóxido. Numa concretização da invenção, na qual a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode ainda

5 incluir uma terceira especificidade de ligação, além de uma especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-CD19. Numa concretização, a terceira especificidade de ligação é uma porção de fator anti-intensificador (EF), como por exemplo, uma

10 molécula que se liga a uma proteína superficial envolvida em atividade citotóxica e assim aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A "porção de fator anti-intensificador" pode ser um anticorpo, um fragmento de anticorpo funcional ou um ligante que se liga a uma dada

15 molécula, como por exemplo, um antígeno ou um receptor, e assim resulta numa intensificação no efeito dos determinantes de ligação para o receptor Fc ou para o antígeno de célula alvo. A "porção de fator anti-intensificador" pode ligar-se a um receptor Fc ou a um

20 antígeno de célula alvo. Alternativamente, a porção de fator anti-intensificador pode ligar-se a uma entidade que seja diferente da entidade à qual a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção de fator anti-intensificador pode ligar-se a uma

25 célula T citotóxica (ex: via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulte numa resposta imune aumentada contra a célula alvo).

Numa concretização, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como especificidade de ligação a

30 pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb ou um Fv de cadeia simples. O anticorpo pode também ser um dímero de cadeia leve ou de cadeia pesada, ou qualquer fragmento mínimo do mesmo, tal como um Fv ou

35 um construto de cadeia simples, conforme descrito na patente americana No. 4.946.778 de Ladner et al. cujo conteúdo foi aqui incorporado expressamente por

referência.

Numa concretização, a especificidade de ligação para um receptor Fc γ é provida por um anticorpo monoclonal, cuja ligação não é bloqueada pela imunoglobulina G humana (IgG). Conforme aqui utilizado, o termo "receptor de IgG" refere-se a qualquer um dos oito genes de cadeia- γ localizados no cromossomo 1. Esses genes codificam um total de doze isoformas transmembrânicas ou de receptor solúvel que são agrupadas em três classes de receptor Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Numa concretização preferida, o receptor Fc γ é um Fc γ RI humano de alta afinidade. O Fc γ RI é um molécula de 72 kDa, que mostra alta afinidade pela IgG monomérica (10^8 - 10^9 M $^{-1}$). A produção e caracterização de certos anticorpos monoclonais anti-Fc γ preferidos são descritas na Publicação PCT WO 88/00052 e na patente americana No. 4.954.617 de Fanger et al., cujos ensinamentos são aqui totalmente incorporados por referência. Esses anticorpos ligam-se a um epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII num sítio que é distinto do sítio de ligação Fc γ do receptor e, assim, sua ligação não é bloqueada substancialmente por níveis fisiológicos de IgG. Anticorpos anti-Fc γ RI específicos úteis na presente invenção são mAb 22, mAb32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma que produz mAb 32 está disponível na American Type Culture Collection, registro ATCC No. HB9469. Em outras concretizações, o anticorpo de receptor anti-Fc γ é uma forma humanizada de anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 é descrita em Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155(10):4996-5002 e Publicação PCT WO 94/10332 de Tempest et al. A linhagem celular produtora de anticorpo H22 foi depositada no "American Type Culture Collection" sob a designação HA022CL1 e tem o número de registro CRL 11177.

Em outras concretizações preferidas ainda, a especificidade de ligação para um receptor Fc é provida por um anticorpo que se liga a um receptor de IgA humana,

como por exemplo, receptor Fc-alfa (Fc α RI(CD89)), cuja ligação é preferivelmente não bloqueada por imunoglobulina A humana (IgA). O termo "receptor de IgA" pretende incluir o produto gênico de um α -gene (Fc α RI) localizado no cromossomo 19. Esse gene é conhecido por codificar diversas isoformas transmembrânicas alternativamente alinhadas de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) é constitutivamente expressado em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, porém não em populações de células não-efetoras. O Fc α RI possui uma afinidade pelo meio ($\sim 5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$) tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta mediante exposição a citocinas tais como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H.C. et al(1996) Critical Review in Immunology 16: 423-440). Quatro anticorpos monoclonais Fc α RI-específicos, identificados como A3, A59, A62 e A77, que ligam-se a Fc α RI fora do domínio de ligação a ligante IgA, foram descritos (Monteiro, R.C. et al.(1992) J.Immunol.148:1764).

Fc α RI e Fc γ RI são receptores gatilho (de ativação) para uso nas moléculas biespecíficas da invenção, pois (1) são expressados principalmente em células efetoras imunes como por exemplo monócitos, PMNs, macrófagos, e células dendríticas; (2) são expressados em altos níveis (ex: 5.000-100.000 por célula); (3) são mediadores de atividades citotóxicas (ex: ADCC, fagocitose); e (4) mediam a apresentação aumentada de antígenos, incluindo os auto-antígenos, a eles direcionados.

Embora os anticorpos monoclonais humanos sejam preferidos, outros anticorpos que podem ser empregados nas moléculas biespecíficas da invenção são anticorpos monoclonais murinos, quiméricos e humanizados.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas conjugando-se as especificidades de ligação constituintes, como por exemplo, as especificidades de ligação anti-FcR e anti-CD19, utilizando métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode

ser gerada separadamente e então conjugada entre si. Quando as especificidades de ligação forem proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes acoplantes ou reticuladores podem ser usados para conjugação covalente.

5 Exemplos de agentes reticuladores incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) e sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato(sulfo-SMCC)

10 (vide, por exemplo, Karpovsky et al.(1984) J.Exp.Med 160:1686; Liu, MA et al.(1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648). Outros métodos incluem os descritos em Paulus (1985) Behring Ins.Mitt.No. 78, 118-132; Brennan et

15 al.(1985) Science 229:81-83, e Glennie et al.(1987) J.Immunol. 139:2367-2375). Agentes conjugantes preferidos são SATA e sulfo-SMCC, da Pierce Chemical Co.(Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação forem anticorpos, eles podem ser conjugados via ligação de

20 sulfidrila das regiões de dobra de terminal C das duas cadeias pesadas. Numa concretização especialmente preferida, a região de dobra é modificada para conter um número ímpar de resíduos sulfidrila, preferivelmente um,

25 antes da conjugação.

Alternativamente, ambas especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressadas e montadas na mesma célula hospedeira. Esse método é especialmente útil quando a molécula biespecífica for um mAb x mAb, mAb

30 x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x proteína de fusão Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia simples compreendendo um anticorpo de cadeia simples e um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia simples compreendendo

35 dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia simples. Métodos para preparar moléculas biespecíficas

são descritos, por exemplo, nas patentes americanas Nos. 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; e 5.482.858, todas aqui expressamente incorporadas por referência.

5 A ligação de moléculas biespecíficas a seus alvos específicos pode ser confirmada, por exemplo, através do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise FACS, bioensaio (ex: inibição de crescimento) ou ensaio Western Blot. Cada
10 um desses ensaios geralmente detecta a presença de complexos proteína-anticorpo de interesse específico empregando um reagente marcado (ex: um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os complexos de anticorpo FcR podem ser detectados
15 utilizando, por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou um fragmento de anticorpo que reconheça e que especificamente ligue-se aos complexos de anticorpo-FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados utilizando-se qualquer um de uma variedade de outros
20 imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser radioativamente marcado e utilizado num radioimunoensaio (RIA) (vide, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986,
25 aqui incorporado por referência). O isótopo radioativo pode ser detectado por meios tal como o uso de contador γ ou um contador de cintilação ou através de autoradiografia.

Composições Farmacêuticas

30 Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção(ões) ligantes ao antígeno dos mesmos, da presente invenção, formulada juntamente com um portador
35 farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de (ex: dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas

biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunokonjugados ou biespecíficos) que ligam-se a diferentes epítomos no antígeno alvo ou que tenham atividades complementares.

Composições farmacêuticas da invenção podem também ser administradas em terapia de combinação, ou seja, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-CD19 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente antiinflamatório ou imunossupressor. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados na terapia de combinação são descritos em maiores detalhes abaixo na seção que trata dos usos dos anticorpos da invenção.

Conforme aqui utilizado, "portador farmacêuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e agentes retardantes de absorção, e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o portador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (ex: por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, ou seja, o anticorpo, imunokonjugado, ou molécula biespecífica, pode ser depositado sobre um material para proteger o composto da ação de ácidos e de outras condições naturais que possam inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis. Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parental e que não causa nenhum efeito toxicológico indesejado (vide, por exemplo, Berge, S.M. et al (1977) J.Pharm.Sci. 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem os derivados de ácidos inorgânicos atóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico,

bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos atóxicos tais como os ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos, ácidos alcanóicos substituídos com fenila, ácido hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Sais de adição de base incluem os derivados de sais metálicos alcalinoterrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio, e similares, bem como de aminas orgânicas atóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

Uma composição farmacêutica da invenção pode também incluir um antioxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bisulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol, e similares; e (3) agentes quelantes metálicos, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e similares.

Exemplos de portadores aquosos e não-aquosos apropriados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similares), e misturas apropriadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, mediante o uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões, e mediante o uso de surfactantes.

Essas composições podem também conter adjuvantes tais

como preservativos, agentes umectantes, agentes emulsificantes, e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microorganismos pode ser garantida tanto pelos procedimentos de esterilização acima citados como
5 pela inclusão de diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol ácido ascórbico, e similares. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e similares nas composições. Além disso, a
10 absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser obtida pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como o monoestearato de alumínio e a gelatina.

Portadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções
15 ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido no estado da técnica. Exceto se qualquer meio ou agente
20 convencional for incompatível com o composto ativo, é previsto o uso dos mesmos nas composições farmacêuticas da invenção. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados às composições.

As composições terapêuticas devem ser tipicamente
25 estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada na forma de uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de fármaco. O portador pode ser um solvente ou meio de
30 dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares) e suas misturas apropriadas. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, mediante o uso de um revestimento tal como lecitina, pela
35 manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e mediante o uso de surfactantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por

exemplo, açúcares, poliálcoóis, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida incluindo-se na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina. Soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas incorporando-se o composto ativo na quantidade requerida num solvente apropriado com um ou uma combinação de ingrediente enumerados acima, conforme necessário, seguido de microfiltração para esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo num veículo estéril que contenha um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles citados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções estéreis injetáveis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e liofilização que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer outro ingrediente desejado de uma solução estéril previamente filtrada do mesmo.

A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do indivíduo a ser tratado, e do modo específico de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma de dosagem única será geralmente aquela quantidade da composição que produza um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, essa quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento do ingrediente ativo, preferivelmente de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, o mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um portador farmacêuticamente aceitável.

Regimes de dosagem são ajustados para prover a resposta ótima desejada (ex: uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolus simples pode ser administrado, diversas

doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular

5 composições parenterais em forma unitária de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma unitária de dosagem, conforme aqui utilizada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados;

10 cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção são ditadas por e

15 diretamente dependente(s) (a) das características inéditas do composto ativo e o efeito terapêutico específico a ser obtido, e (b) das limitações inerentes à técnica de se combinar tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

20 Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais usualmente de 0,01 a 5 mg/kg do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso

25 corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento representativo envolve a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada três

30 meses, ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de dosagem preferidos para um anticorpo anti-CD19 da invenção incluem 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal via administração intravenosa, com o anticorpo sendo administrado utilizando-se um dos

35 seguintes esquemas de dosagem: (i) a cada quatro semanas para seis dosagens, e então a cada três meses; (ii) a cada três semanas; (iii) 3 mg/kg peso corporal uma vez

seguido de 1 mg/kg de peso corporal a cada três semanas. Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, e neste caso a dosagem de cada anticorpo administrado enquadra-se nas faixas indicadas. O anticorpo é geralmente administrado em ocasiões múltiplas. Intervalos entre dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanalmente, mensalmente, a cada três meses ou anualmente. Os intervalos também podem ser irregulares conforme indicado medindo-se os níveis sangüíneos de anticorpo em relação ao antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma concentração plasmática de anticorpo de cerca de 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ e em alguns métodos de cerca de 25-300 $\mu\text{g/ml}$.

Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação sustentada, onde é necessária a administração menos freqüente. A dosagem e a freqüência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente.

Em geral, anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguido dos anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, e anticorpos não-humanos. A dosagem e freqüência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente não freqüentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento pelo resto da vida. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes necessária até que a progressão da doença seja reduzida ou extinta, e preferivelmente até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Em seguida, o paciente pode receber um regime profilático.

Os níveis efetivos de dosagem dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem variar de forma a se obter uma quantidade do ingrediente

ativo que seja eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração específicos, sem ser tóxica para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma
5 variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições específicas da presente invenção empregadas, ou do éster, sal ou amida das mesmas, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto específico
10 que estiver sendo empregado, da duração do tratamento, de outros fármacos, compostos e/ou materiais utilizados em combinação com as composições específicas empregadas, da faixa etária, do sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico prévio do paciente em tratamento, e
15 fatores similares bastante conhecidos no estado da técnica médica.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-CD19 da invenção preferivelmente resulta em redução na severidade dos sintomas da doença, em um aumento na
20 freqüência e duração dos períodos livres de sintomas da doença, ou na prevenção de deficiência ou incapacidade devido à aflição causada pela doença. Por exemplo, para o tratamento de tumores mediados por CD19*, uma "dosagem terapeuticamente eficaz" preferivelmente inibe o
25 crescimento celular ou o crescimento tumoral em cerca de pelo menos 20%, mais preferivelmente em cerca de pelo menos 40%, ainda mais preferivelmente em cerca de pelo menos 60%, e ainda mais preferivelmente em cerca de pelo menos 80% em relação aos indivíduos não tratados. A
30 capacidade de um composto inibir o crescimento tumoral pode ser avaliada num sistema de modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, essa propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando-se a capacidade de o composto inibir o
35 crescimento celular, tal inibição podendo ser medida *in vitro* através de ensaios conhecidos no estado da técnica. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto

terapêutico pode reduzir o tamanho do tumor, ou de outra forma melhorar sintomas num indivíduo. Um habilitado na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com base em fatores tais como, tamanho do indivíduo, 5 severidade dos sintomas do indivíduo, e a composição específica ou via de administração escolhida.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada através de uma ou mais vias de administração utilizando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos no estado da técnica. Conforme será apreciado pelos 10 habilitados na técnica, a via e/ou o modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Vias preferidas de administração para anticorpos da invenção incluem as vias intravenosa, 15 intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras vias parenterais de administração, como por exemplo, através de injeção ou infusão. A expressão "administração parenteral" conforme aqui utilizada significa os modos de administração que não a 20 administração enteral e tópica, geralmente através de injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, 25 intraarticular, subcapsular, subaraquínóide, intraespinhal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser administrado através de uma via não parenteral, tal como a via de administração tópica, epidérmica ou mucosal, por 30 exemplo, por via intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou tópica.

Os compostos ativos podem ser preparados com portadores que protejam o composto contra liberação rápida, tal como formulação de liberação controlada, incluindo os 35 implantes, adesivos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil

acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos no estado da técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc.New York, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, numa concretização preferida, uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos descritos nas patentes americanas Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bastante conhecidos e úteis na presente invenção incluem: patente americana No. 4.487.603 que descreve uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar medicação a uma taxa controlada; a patente americana No. 4.486.194, que descreve um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; a patente americana No. 4.447.233, que descreve uma bomba de infusão de medicação para liberar medicação a uma taxa de infusão precisa; a patente americana 4.447.224 que descreve um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua de fármaco; a patente americana No. 4.439.196 que descreve um sistema osmótico de liberação de fármaco tendo compartimentos de câmaras múltiplas; e a patente americana No. 4.475.196, que descreve um sistema osmótico de liberação de fármaco.Essas patentes são aqui incorporadas por referência. Muitos outros desses implantes, sistemas de liberação, e módulos são conhecidos no estado da técnica.

Em certas concretizações, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para garantir a distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hemato-encefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente

hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção atravessem a barreira hemato-encefálica (BBB) (se desejado) eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de preparação de lipossomas, 5 vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas para dentro de células ou órgãos específicos, para assim aumentar a liberação direcionada de fármaco (vide, por exemplo, V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol.29:685). Porções direcionadoras representativas incluem o folato 10 ou a biotina (vide, por exemplo, a patente americana No. 5.416.016 de Low et al.); manosídeos (Umezawa et al., (1988) Biochem.Biophys.Res.Comm. 153:1038); anticorpos (P.G.Bloeman et al.(1995) FEBS Lett.357:140; 15 M.Owais et al.(1995) Antimicrob.Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A de surfactante (Briscoe et al.(1995) Am.J.Physiol.1233:134); p120 (Schreier et al.(1994) J.Biol.Chem.269:9090); vide também K.Keinanen; 20 M.L.Laukkanen (1994) FEBS Lett.346:123; J.J.Killion; I.J.Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos e Métodos

Os anticorpos, especialmente os anticorpos humanos, as composições de anticorpos e os métodos da presente 25 invenção possuem numerosas utilidades terapêuticas e diagnósticas *in vitro* e *in vivo*, envolvendo o diagnóstico e o tratamento de distúrbios mediados por CD19. Por exemplo, essas moléculas podem ser administradas a células em cultura, *in vitro* ou *ex vivo*, ou a indivíduos 30 humanos, como por exemplo, para tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de distúrbios.

Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" pretende incluir animais humanos e não-humanos. Animais não-humanos incluem todos os vertebrados, como por exemplo, 35 mamíferos e não-mamíferos, tais como os primatas não-humanos, carneiros, cães, vacas, cavalos, frangos, anfíbios, e répteis. Indivíduos preferidos incluem

pacientes humanos que apresentam distúrbios mediados pela atividade de CD19. Os métodos são especialmente apropriados para tratar pacientes humanos que apresentam um distúrbio associado com expressão aberrante de CD19.

5 Quando anticorpos contra CD19 são administrados juntamente com outro agente, os dois podem ser administrados em qualquer ordem ou simultaneamente.

Dada a ligação específica dos anticorpos da invenção a CD19, os anticorpos da invenção podem ser usados para
10 especificamente detectar a expressão de CD19 na superfície de células e, além disso, podem ser usados para purificar CD19 via purificação de imunoafinidade.

Outrossim, dada a expressão de CD19 em diversas células tumorais, os anticorpos humanos, as composições de
15 anticorpos e os métodos da presente invenção podem ser usados para tratar um indivíduo com um distúrbio tumorigênico, como por exemplo, um distúrbio caracterizado pela presença de células tumorais expressando CD19 incluindo, por exemplo, linfoma não-
20 Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas anaplásticos de grandes células (ALCL), mieloma múltiplo, linfomas cutâneos de célula T, linfomas nodulares de pequenas células clivadas, linfomas linfocíticos,
25 linfomas de células T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T do adulto (T-ALL), cânceres, linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de
30 grandes células de linhagem B, linfoma de células T similar à linfadenopatia angioimunoblástica (AILD), linfomas em cavidade corporal associados ao HIV, carcinomas embrionários, carcinomas indiferenciados da rinofaringe (ex: tumor de Schmincke), doença de
35 Castleman, Sarcoma de Kaposi, Mieloma Múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, e outros linfomas de células B.

Adicionalmente, a superexpressão de CD19 pode levar à perda de tolerância à células B e à geração de distúrbios autoimunes (Tedder et al.(2005) Curr Dir Autoimmun.8:55). Esse efeito autoimune foi observado pelo acúmulo de CD19+células-B nas articulações inflamadas em pacientes com artrite reumatóide (He et al.(2001) J.Rheumatol 28:2168). Como tal, os anticorpos humanos, as composições de anticorpos e os métodos da presente invenção podem ser usados para tratar um indivíduo com um distúrbio autoimune, como por exemplo, um distúrbio caracterizado pela presença de células B expressando CD19 incluindo, por exemplo, artrite reumatóide.

Em uma concretização, os anticorpos (ex: anticorpos monoclonais humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e composições) da invenção podem ser usados para detectar níveis de CD19 ou níveis de células que contenham CD19 em sua superfície membrânica, cujos níveis possam então ser ligados a certos sintomas de doenças. Alternativamente, os anticorpos podem ser usados para inibir ou bloquear a função de CD19 que, por sua vez, pode estar ligada à prevenção ou melhora nos sintomas de certas doenças, implicando assim CD19 como um mediador da doença. Isso pode ser obtido contatando-se uma amostra e uma amostra de controle com o anticorpo anti-CD19 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e o CD19. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e CD19 são detectados e comparados na amostra e no controle.

Em outra concretização, os anticorpos (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e composições) da invenção podem ser inicialmente testados quanto à atividade de ligação associada com o uso terapêutico ou o diagnóstico *in vitro*. Por exemplo, as composições da invenção podem ser testadas utilizando-se os ensaios citométricos de fluxo descritos nos exemplos abaixo.

Os anticorpos (ex: anticorpos humanos, moléculas

multiespecíficas e biespecíficas, imunoconjugados e composições) da invenção possuem atividade adicional na terapia e diagnóstico de doenças relacionadas com CD19. Por exemplo, os anticorpos monoclonais humanos, as

5 moléculas multiespecíficas e biespecíficas e os imunoconjugados podem ser usados para induzir *in vivo* ou *in vitro* uma ou mais das seguintes atividades biológicas: inibir o crescimento de e/ou matar uma célula expressando CD19; mediar a fagocitose ou ADCC de uma célula

10 expressando CD19 na presença de células efetoras humanas, ou bloquear a ligação de ligante CD19 a CD19.

Numa concretização específica, os anticorpos (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e composições) são usados *in vivo* para

15 tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de doenças relacionadas com CD19. Exemplos de doenças relacionadas com CD19 incluem, entre outras, distúrbios autoimunes, artrite reumatóide, câncer, linfoma não-Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt, linfomas

20 anaplásicos de grandes células (ALCL), mieloma múltiplo, linfomas cutâneos de célula T, linfomas nodulares de pequenas células clivadas, linfomas linfocíticos, linfomas de células T periféricos, linfomas de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas de células T

25 (ATLL), leucemia de células T do adulto (T-ALL), linfomas foliculares entroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de grandes células de linhagem B, linfoma de células T similar à linfadenopatia angioimunoblástica (AILD), linfomas em cavidade corporal

30 associados ao HIV, carcinomas embrionários, carcinomas indiferenciados da rinofaringe (ex: tumor de Schmincke), doença de Castleman, Sarcoma de Kaposi, Mieloma Múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, e outros linfomas de células B.

35 Vias apropriadas para administração das composições de anticorpo (ex: anticorpos monoclonais humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da

invenção *in vivo* e *in vitro* são bastante conhecidos no estado da técnica e podem ser selecionados pelo habilitado na técnica. Por exemplo, as composições de anticorpos podem ser administradas através de injeção (ex: intravenosa ou subcutânea). Dosagens apropriadas das moléculas utilizadas dependerão da faixa etária e do peso do indivíduo e da concentração e/ou formulação da composição de anticorpo.

Conforme previamente descrito, os anticorpos anti-CD19 humanos da invenção podem ser co-administrados com um ou mais outros agentes terapêuticos, como por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressor. O anticorpo pode ser ligado ao agente (na forma de imunocomplexo) ou pode ser administrado separadamente do agente. No último caso (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, após ou concomitantemente com o agente ou pode ser co-administrado com outras terapias conhecidas, como por exemplo, uma terapia anti-câncer, como por exemplo, radiação. Tais agentes terapêuticos incluem, entre outros, agentes antineoplásicos tais como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina, cisplatina, carmustina, clorambucil, e ciclofosfamida hidroxiuréia que, por si só são eficazes apenas a níveis tóxicos ou subtóxicos para o paciente. A cisplatina é intravenosamente administrada como uma dose de 100 mg/ml uma vez a cada quatro semanas e a adriamicina é intravenosamente administrada como uma dose de 60-75 mg/ml uma vez a cada 21 dias. A co-administração dos anticorpos anti-CD19 humanos, ou os fragmentos ligantes ao antígeno dos mesmos, da presente invenção com agentes quimioterápicos provê dois agentes anti-câncer que operam através de diferentes mecanismos que produzem um efeito citotóxico para as células tumorais humanas. Tal co-administração pode resolver problemas devido ao desenvolvimento de resistência a fármacos ou uma alteração na antigenicidade das células tumorais o que as

tornaria não reativas com o anticorpo.

Células efetoras alvo-específicas, como por exemplo as células efetoras ligadas a composições (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção podem também ser usadas como agentes terapêuticos. Células efetoras alvo-específicas podem ser leucócitos humanos tais como macrófagos, neutrófilos ou monócitos. Outras células incluem eosinófilos, células matadoras naturais, e outras células portando receptor IgG ou IgA. Se desejado, as células efetoras podem ser obtidas do indivíduo a ser tratado. As células efetoras alvo-específicas podem ser administradas na forma de suspensão de células numa solução fisiologicamente aceitável. O número de células administradas pode ser na ordem de 10^8 - 10^9 mas variará dependendo do fim terapêutico. Em geral, a quantidade será suficiente para obter localização na célula alvo, como por exemplo, uma célula tumoral expressando CD19, e para efetuar morte de células, como por exemplo, fagocitose. As vias de administração podem também variar.

A terapia com células efetoras alvo-específicas pode ser realizada em conjunto com outras técnicas para remoção de células atingidas. Por exemplo, a terapia anti-tumoral utilizando as composições (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção e/ou as células efetoras armadas com essas composições pode ser utilizada juntamente com a quimioterapia. Adicionalmente, a imunoterapia de combinação pode ser usada para direcionar duas populações efetoras citotóxicas distintas para rejeição de célula tumoral. Por exemplo, os anticorpos anti-CD19 ligados a anti-Fc-gama ou anti-CD3 podem ser usados em conjunto com agentes ligantes específicos ao receptor IgG ou IgA.

Moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção podem também ser usadas para modular FcγR ou níveis de FcγR em células efetoras, tal como capeando e eliminando receptores da superfície da célula. Misturas de

receptores anti-Fc podem também ser usados para essa finalidade.

As composições (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção que possuem sítios de ligação a complemento, tais como as porções de IgG1, 2 ou 3 ou IgM que ligam-se ao complemento, podem também ser usadas na presença de complemento. Em uma concretização, o tratamento ex vivo de uma população de células compreendendo células alvo com um agente ligante da invenção e células efetoras apropriadas pode ser complementado pela adição de complemento ou soro contendo complemento.

A fagocitose de células alvo revestidas com um agente ligante da invenção pode ser melhorada através de ligação de proteínas de complemento. Em outra concretização, as células alvo revestidas com as composições (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção podem também ser lisadas pelo complemento. Em outra concretização ainda, as composições da invenção não ativam o complemento.

As composições (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção podem também ser administrados juntamente com o complemento. Em certas concretizações, a presente descrição provê composições compreendendo anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas e soro ou complemento. Essas composições podem ser vantajosas quando o complemento está localizado em estreita proximidade com os anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas. Alternativamente, os anticorpos humanos, as moléculas multiespecíficas ou biespecíficas da invenção e o complemento ou soro podem ser administrados separadamente.

Estão também no escopo da presente invenção os kits compreendendo as composições de anticorpo da invenção (ex: anticorpos humanos, moléculas biespecíficas e multiespecíficas, ou imunoconjugados) e as instruções de

uso. O kit pode ainda conter um ou mais reagentes adicionais, tal como um reagente imunossupressor, um agente citotóxico ou um agente radiotóxico, ou um ou mais anticorpos humanos adicionais da invenção (ex: um anticorpo humano tendo uma atividade complementar que se
5 liga a um epítopo no antígeno CD19 distinto do primeiro anticorpo humano).

Conseqüentemente, os pacientes tratados com as composições de anticorpo da invenção podem ser
10 adicionalmente administrados (antes de ou simultaneamente com ou após administração de um anticorpo humano da invenção) com outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou radiotóxico, que intensifica ou aumenta o efeito terapêutico dos anticorpos humanos.

15 Em outras concretizações, o indivíduo pode ser adicionalmente tratado com um agente que modula, como por exemplo, intensifica ou inibe a expressão ou atividade de Fc γ ou de receptores Fc γ como por exemplo tratando o indivíduo com uma citocina. Citocinas preferidas para
20 administração durante o tratamento com a molécula multiespecífica incluem fator estimulante de colônias de granulócitos ("G-CSF"), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos ("GM-CSF"), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF).

25 As composições (ex: anticorpos humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas) da invenção podem também ser usadas para direcionar células expressando Fc γ ou CD19, por exemplo, para marcar tais células. Para esse uso, o agente ligante pode ser ligado a uma molécula que
30 possa ser detectada. Assim, a invenção provê métodos para localizar células ex vivo ou in vitro expressando receptores Fc, tais como Fc γ R ou CD19. O marcador detectável pode ser, por exemplo, um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator
35 enzimático.

Numa concretização específica, a invenção provê métodos para detectar a presença de antígeno CD19 numa amostra,

ou medir a quantidade de antígeno CD19, compreendendo
contatar a amostra, e a amostra de controle, com um
anticorpo monoclonal humano, ou uma porção ligante ao
antígeno do mesmo, que especificamente liga-se a CD19,
5 sob condições que permitam a formação de um complexo
entre o anticorpo e a porção do mesmo e CD19. A formação
de um complexo é então detectada, sendo que uma formação
de complexo diferente entre a amostra comparada com a
amostra de controle indica a presença de antígeno CD19 na
10 amostra.

Em outras concretizações, a invenção provê métodos para
tratar um distúrbio mediado por CD19 num indivíduo, por
exemplo, um distúrbio autoimune, artrite reumatóide,
câncer, linfoma não-Hodgkin, leucemia linfocítica aguda
15 (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de
Burkitt, linfomas anaplásticos de grandes células (ALCL),
mieloma múltiplo, linfomas cutâneos de célula T, linfomas
nodulares de pequenas células clivadas, linfomas
linfocíticos, linfomas de células T periféricos, linfomas
20 de Lennert, linfomas imunoblásticos, leucemia/linfomas de
células T (ATLL), leucemia de células T do adulto (T-
ALL), cânceres, linfomas foliculares
entoblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de
grandes células de linhagem B, linfoma de células T
25 similar à linfadenopatia angioimunoblástica (AILD),
linfomas em cavidade corporal associados ao HIV,
carcinomas embrionários, carcinomas indiferenciados da
rinofaringe (ex: tumor de Schmincke), doença de
Castleman, Sarcoma de Kaposi, Mieloma Múltiplo,
30 macroglobulinemia de Waldenstrom, e outros linfomas de
células B, administrando-se ao indivíduo os anticorpos
humanos descritos acima. Tais anticorpos e seus derivados
são usados para inibir atividades induzidas por CD19
associadas com certos distúrbios, como por exemplo,
35 proliferação e diferenciação. Ao se contatar o anticorpo
com CD19 (ex: administrando-se o anticorpo ao indivíduo),
a capacidade de o CD19 induzir tais atividades é inibida

e, assim, o distúrbio associado é tratado. A composição de anticorpo pode ser administrada isoladamente ou juntamente com outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou radiotóxico que atua em conjunto ou
5 sinergicamente com a composição de anticorpo para tratar ou prevenir a doença mediada por CD19.

Em outra concretização ainda, os imunoconjugados da invenção podem ser usados para direcionar compostos (ex: agentes terapêuticos, marcadores, citotoxinas,
10 radiotoxinas, imunossuppressores, etc.) a células que possuam receptores de superfície celular de CD19, ligando tais compostos ao anticorpo. Por exemplo, um anticorpo anti-CD19 pode ser conjugado a qualquer um dos compostos de toxina descritos nas patentes americanas Nos.
15 6.281.354, e 6.548.530, publicação de patente americana Nos. 20030050331, 20030064984, 20030073852 e 20040087497 ou publicado em WO 03/022806. Assim, a invenção também provê métodos para localizar células *ex vivo* ou *in vivo* expressando CD19 (ex: com um marcador detectável, tal
20 como um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima ou um co-fator enzimático). Alternativamente, os imunoconjugados podem ser usados para matar células que tenham receptores de superfície celular de CD19 direcionando citotoxinas ou radiotoxinas a CD19.

25 EXEMPLOS

Exemplo 1 : Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos contra CD19

Antígeno

As linhagens de células-B tumorais de Raji (Registro ATCC
30 #CCL-86) e de Daudi (Registro ATCC #CCL-213) foram usadas como antígeno para imunização.

KM-MOUSE® Camundongo Transcromossômico Transgênico

Anticorpos monoclonais totalmente humanos contra CD19 foram preparados utilizando a cepa KM de camundongos
35 transcromossômicos transgênicos, que expressa os genes de anticorpo humano. Nessa cepa de camundongo, o gene de cadeia leve kappa de camundongo endógeno foi

homozigotamente rompido conforme descrito em Chen et al.(1993) EMBO J.12:811-820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno foi homozigotamente rompido conforme descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187 para camundongos HuMab. O camundongo carrega um transgene de cadeia leve kappa humano, o KCo5, conforme descrito em Fishwild et al.(1996) Nature Biotechnology 14:845-851. O camundongo também carrega um transcromossomo de cadeia pesada humano, o SC20, conforme descrito na Publicação PCT WO 02/43478.

Imunizações de KM-MOUSE®

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos contra CD19, grupos de camundongos KM-MOUSE® foram imunizados com linhagem de células-B tumorais de Raji ou Daudi. Esquemas gerais de imunização são descritos em Lonberg, N. et al.(1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et al.(1996) Nature Biotechnology 14;845-851 e publicação PCT WO 98/24884. Os camundongos tinham de 6-16 semanas de vida quando da primeira infusão de antígeno. Uma preparação de células foi utilizada para imunizar os camundongos (KM-MOUSE®) intraperitonealmente (IP).

Os camundongos transgênicos foram imunizados duas vezes com antígeno em adjuvante de Freund completo ou adjuvante de Ribí IP, seguido de 3-21 dias IP (até um total de 11 imunizações) com o antígeno em adjuvante de Freund ou Ribí incompleto. A resposta imune foi monitorada através de sangramentos retroorbitais. O plasma foi examinado através do teste ELISA (conforme descrito abaixo) e os camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-CD19 foram usados para as fusões. Os camundongos foram reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço.

Seleção de um KM-MOUSE® Produtor de Anticorpos Anti-CD19:

Para selecionar um KM-MOUSE® produtor de anticorpos que se ligam a CD19, os soros de camundongos imunizados foram testados através de um teste ELISA modificado conforme

originalmente descrito por Fishwild, D. et al. (1996), supra. Resumidamente, as placas de microtitulação foram revestidas com proteína de fusão CD19 recombinante purificada a 1-2 $\mu\text{g/ml}$ em PBS, 50 μl /cavidades incubadas a 4°C da noite para o dia e então bloqueadas com 200 μl /cavidade de BSA 5% em PBS. As diluições de plasma de camundongos imunizados contra CD19 foram adicionadas a cada cavidade e incubadas durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e então incubadas com um anticorpo policlonal de cadeia leve kappa anti-humano de cabra conjugado com fosfatase alcalina durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato pNPP e analisadas através de espectrofotômetro a OD 415-650. Os camundongos que desenvolveram os títulos mais elevados de anticorpos ao anti-CD19 foram usados para as fusões. As fusões foram realizadas conforme descrito abaixo e os sobrenadantes de hibridoma foram testados quanto à atividade anti-CD19 através de teste ELISA.

Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais Humanos contra CD19

Esplenócitos de camundongo, isolados de camundongo KM-MOUSE® foram fundidos com PEG numa linhagem celular de mieloma de camundongo utilizando PEG com base em protocolos padrão ou eletrofusão baseada em campo elétrico utilizando um eletroporador para fusão de células em câmara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Os hibridomas resultantes foram então examinados quanto à produção de anticorpos antígeno-específicos. Suspensões de células simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados foram fundidas a um quarto do número de células de mieloma de camundongo não-secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com 50% PEG (Sigma). As células foram plaqueadas em aproximadamente 1×10^5 /cavidade em placa de microtitulação de fundo plano, seguido de cerca de duas semanas de incubação em meio seletivo contendo soro fetal bovino a

10%, meio condicionado P388D1 a 10% (ATCC, CRL TIB-63), 3-5% origem (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013 com alta glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio no qual HAT foi substituído por HT. Cavidades individuais foram então examinadas através de teste ELISA (descrito acima) para detectar anticorpos IgG monoclonais anti-CD19 humanos. Ocorrido o crescimento extensivo do hibridoma, o meio foi monitorado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpo foram replaqueados, novamente examinados e, se ainda positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-CD19 foram subclonados pelo menos duas vezes através de diluição limitada. Os subclones estáveis foram então cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização posterior. Os clones de hibridoma 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8 foram selecionados para análise adicional.

Exemplo 2 : Caracterização Estrutural de Anticorpos Monoclonais Humanos 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8

As seqüências de cDNA codificando as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 21D4 e 21D4a foram obtidas do hibridoma 21D4 utilizando técnicas PCR padrão e foram seqüenciadas utilizando-se as técnicas de seqüenciamento de DNA padrão. Observa-se que o hibridoma 21D4 produz anticorpos contendo uma cadeia pesada que emparelha com uma de duas cadeias leves (SEQ ID NOS 8 e 9). Ambos anticorpos (ou seja, 21D4 com seqüências V_H e V_L de SEQ ID NOS 1 e 8, respectivamente, e 21D4a com seqüências V_H e V_L de SEQ ID NOS: 1 e 9, respectivamente) ligam-se a CD19. As seqüências de cDNA codificando as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e

46E8 foram obtidas dos hibridomas 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3, 3C10, 5G7, 13F1 e 46E8, respectivamente, utilizando técnicas PCR padrão e foram seqüenciadas utilizando técnicas padrão de seqüenciamento de DNA.

5 As seqüências de nucleotídeos e de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 21D4 são mostradas na Figura 1A e em SEQ ID NO: 59 e 1, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e de aminoácido da região variável de cadeia leve de 21D4 são mostradas na Figura

10 1B e em SEQ ID NO: 66 e 68, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 21D4 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 21D4 utiliza um segmento V_H de linha

15 germinal humana V_H 5-51, um segmento D da linha germinal humana 3-10, e um segmento J_H de linha germinal humana J_H 4b. O alinhamento da seqüência V_H 21D4 com a seqüência V_H 5-51 de linha germinal é mostrado na Figura 8. Outra análise da seqüência V_H 21D4 utilizando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3, conforme
20 mostrado nas Figuras 1A e 8, e nas SEQ ID NOs: 16, 23, e 30, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia
25 leve 21D4 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia leve 21D4 utiliza um segmento V_L de V_K L18 de linha germinal humana e um segmento J_K de linha germinal humana JK 2. O alinhamento da seqüência

30 21D4 V_L com a seqüência V_K L18 de linha germinal é mostrado na Figura 15. Outra análise da seqüência V_L 21D4 utilizando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 1B e 15, e nas SEQ
35 ID NOs: 37, 44 e 51, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 21D4a com as conhecidas seqüências de cadeia

pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 21D4a utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 5-51, um segmento D da linha germinal humana 3-10, e um segmento J_H da linha germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência 21D4a V_H com a seqüência V_H 5-51 de linha germinal é mostrado na Figura 8. Outra análise da seqüência V_H 21D4a utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 1A e 8, e as SEQ ID NOs: 16, 23 e 30, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 21D4a com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 21D4a utiliza um segmento V_L da linha germinal humana V_k L18 e um segmento J_k da linha germinal humana JK3. O alinhamento da seqüência V_L 21D4a com a seqüência de linha germinal V_k L18 é mostrado na Figura 16. Outra análise da seqüência V_L 21D4a utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 1C e 16, e as SEQ ID NOs: 37, 44 e 52, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 47G4 são mostradas na Figura 2 e nas SEQ ID NOs: 60 e 2, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 47G4 são mostradas na Figura 2B e SEQ ID NO: 68 e 10, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobilina de cadeia pesada 47G4 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 47G4 utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 6-19, e um segmento J_H da linha germinal humana JH 5b. O alinhamento da seqüência V_H 47G4 com a seqüência V_H 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 9. Outra

análise da seqüência V_H 47G4 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 nas Figuras 2A e 9, e nas SEQ ID NOs: 17, 24 e 31, respectivamente.

5 A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 47G4 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 47G4 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K A27 e um segmento JK de linha germinal humana JK 3. O alinhamento da seqüência V_L 47G4 com a
10 seqüência de linha germinal V_K A27 é mostrado na Figura 17. Outra análise da seqüência V_L 47G4 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3
15 conforme mostram as Figuras 2B e 17, e as SEQ ID NOs: 38, 45 e 53, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 27F3 são mostradas na Figura 3A e nas SEQ ID NOs: 61 e 3, respectivamente.

20 As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 27F3 são mostradas na Figura 3 e nas SEQ ID NOs: 69 e 11, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 27F3 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada
25 de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 27F3 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 5-51, um segmento D da linha germinal humana 6-19, e um segmento J_H de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da seqüência V_H 27F3 com a seqüência da
30 linha germinal V_H 5-51 é mostrado na Figura 10. Outra análise da seqüência V_H 27F3 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 nas Figuras 3A e 10, e nas SEQ ID NOs: 18, 25 e 32, respectivamente.

35 A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 27F3 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a

cadeia leve 27F3 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L18 e um segmento J_K de linha germinal humana JK 2. O alinhamento da sequência V_L 27F3 com a sequência V_K L18 de linha germinal humana é mostrado na Figura 18.

5 Outra análise da sequência V_L 27F3 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 3B e 18, e as SEQ ID NOs: 39, 46 e 54, respectivamente.

10 As sequências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 3C10, são mostradas na Figura 4A e nas SEQ ID NOs: 62 e 4, respectivamente.

As sequências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 3C10, são mostradas na Figura 15 4B e nas SEQ ID NOs: 70 e 12, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada 3C10 com as conhecidas sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 3C10 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 1-26, e um segmento J_H de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da sequência V_H 3C10 com a sequência V_H 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 11. Outra análise da sequência V_H 3C10 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das 25 regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 4A e 11, e as SEQ ID NOs: 19, 26 e 33, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia 30 leve 3C10 com as conhecidas sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 3C10 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L15 e um segmento J_K de linha germinal humana JK2. O alinhamento da sequência V_L 3C10 com a sequência 35 V_K L15 da linha germinal é mostrado na Figura 19. Outra análise da sequência V_L 3C10 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das

regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 4B e 19, e as SEQ ID NOS: 40, 47 e 55, respectivamente.

5 As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 5G7, são mostradas na Figura 5A e nas SEQ ID NOS: 63 e 5, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 5G7, são mostradas na Figura 5B e nas SEQ ID NOS: 71 e 13, respectivamente.

10 A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 5G7 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 5G7 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 5-51, um segmento D da linha germinal
15 humana 3-10, e um segmento J_H de linha germinal humana J_H 6b. O alinhamento da seqüência V_H 5G7 com a seqüência V_H 5-51 de linha germinal é mostrado na Figura 12. Outra análise da seqüência V_H 5G7 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das
20 regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 5A e 12, e as SEQ ID NOS: 20, 27 e 34, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 5G7 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de
25 imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 5G7 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_L L18 e um segmento J_K de linha germinal humana J_K 1. O alinhamento da seqüência V_L 5G7 com a seqüência V_K L18 de linha germinal é mostrado na Figura 20. Outra
30 análise da seqüência V_L 5G7 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 5B e 20, e as SEQ ID NOS: 41, 48 e 56, respectivamente.

35 As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 13F1, são mostradas na Figura 6A e nas SEQ ID NOS: 64 e 6, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 13F1, são mostradas na Figura 6B e nas SEQ ID NOs: 72 e 14, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 13F1 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 13F1 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 5-51, um segmento D da linha germinal humana 6-19 e um segmento J_H de linha germinal humana JH6b. O alinhamento da seqüência V_H 13F1 com a seqüência V_H 5-51 da linha germinal é mostrado na Figura 13. Outra análise da seqüência V_H 13F1 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 6A e 13, e as SEQ ID NOs: 21, 28 e 35, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 13F1 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 13F1 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L18, e um segmento J_K de linha germinal humana JK2. O alinhamento da seqüência V_L 13F1 com a seqüência V_K L18 da linha germinal é mostrado na Figura 21. Outra análise da seqüência V_L 13F1 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 6B e 21, e as SEQ ID NOs: 42, 49 e 57, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 46E8, são mostradas na Figura 7A e nas SEQ ID NOs: 65 e 7, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 46E8, são mostradas na Figura 7B e nas SEQ ID NOs: 73 e 15, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 46E8 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que

a cadeia pesada 46E8 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 5-51, um segmento D da linha germinal humana 6-19 e um segmento J_H de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da seqüência V_H 46E8 com a seqüência V_H 5-51 da linha germinal é mostrado na Figura 14. Outra análise da seqüência V_H 46E8 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 7A e 14, e as SEQ ID NOS: 22, 29 e 36, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 46E8 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 46E8 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L18, e um segmento J_K de linha germinal humana JK2. O alinhamento da seqüência V_L 46E8 com a seqüência V_K L18 da linha germinal é mostrado na Figura 22. Outra análise da seqüência V_L 46E8 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 7B e 22, e as SEQ ID NOS: 43, 50 e 58, respectivamente.

Exemplo 3 : Caracterização de Especificidade de Ligação e Cinética de Ligação de Anticorpos Monoclonais Humanos Anti-CD19.

Neste exemplo, a afinidade de ligação dos anticorpos anti-CD19 21D4 e 47G4 foi examinada através de análise ELISA.

Especificidade de Ligação através de ELISA

Placas de microtitulação foram revestidas com 50 µl de proteína de fusão CD19-Fc purificada de extensão completa em 1,0 µg/ml em PBS, e então bloqueadas com 150 µl de albumina de soro bovino a 1% em PBS. As placas foram deixadas incubar de 30 minutos a 1 hora e lavadas três vezes. As diluições do anticorpo anti-CD19 HuMAb 47G4 foram adicionadas a cada cavidade e incubadas durante 1 hora a 37°C. Um anticorpo anti-CD19 murino conhecido foi

usado como controle positivo. As placas foram lavadas com PBS/Tween e então incubadas com um reagente secundário de IgG Kappa-específico anti-humano de cabra conjugado com horseradish peroxidase durante 1 hora a 37°C. Após lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato ABTS (1,46 mMol/L) e analisadas em OD de 490 nm. Os resultados constam da Figura 23. O HuMaB CD19 47G4 ligou-se especificamente ao peptídeo CD19 humano.

Mapeamento de Epítipo de Anticorpos Anti-CD19

10 Citometria de fluxo foi utilizada para determinar o agrupamento de epítipo de HuMAbs anti-CD19. A ligação ao epítipo dos anticorpos monoclonais humanos anti-CD19 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q e 13F1 foi avaliada incubando-se células-B tumorais de Raji com 0,3
15 μ g/ml de anticorpo monoclonal humano anti-CD19 biotinilado 21D4 ou 21D4a, seguido de lavagem e da adição de um anticorpo monoclonal humano anti-CD19 frio. Um anticorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo. A ligação foi detectada com um Ab IgG anti-
20 humano marcado com FITC. As análises citométricas de fluxo foram conduzidas utilizando citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são mostrados na Figura 24. Quando da análise dos dados, os anticorpos anti-CD19 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7 e 13F1
25 competem pela mesma região de epítipo.

Exemplo 4 : Ligação de Anticorpos CD19 a uma Linhagem de Célula-B Tumoral

Foi avaliada a ligação de HuMAbs CD19 através de citometria de fluxo a linhagens de célula-B tumoral de
30 Raji e Daudi, ou a linhagem celular transfectada CHO-CD19. As células de CHO foram transfectadas com um plasmídeo de expressão contendo o cDNA de extensão completa codificando a forma transmembrânica de CD19. As linhagens celulares de Raji, Daudi, e CD19-CHO foram
35 incubadas com um dos seguintes HuMAbs CD19: 21D4, 21D4a, 47G4, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 3C10 ou 13F1. Um anticorpo anti-CD19 murino conhecido foi usado como controle

positivo. As células foram lavadas e detectadas através de um anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-humano marcado com ficoeritrina e analisadas através de citometria de fluxo. Os resultados para ligação à
 5 linhagem celular CHO-CD19, à linhagem de célula-B de Daudi, à linhagem de célula-B de Raji e uma ligação expandida estabelecida contra a linhagem de célula B de Raji são mostradas nas Figuras 25A, 25B, 25C e 25D, respectivamente. Os anticorpos monoclonais humanos anti-
 10 CD19, 21D4 e 47G4, ligaram-se à linhagem celular CHO-CD19. Os anticorpos monoclonais humanos anti-CD19, 21D4, 21D4a, 47G4, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 3C10 e 13F1 ligaram-se à linhagem de célula-B de Raji. Os anticorpos HuMAb anti-CD19 21D4, 21D4a, 3C10, 5G7-N19K, 5G7-N19Q e
 15 13F1 tiveram valores EC_{50} calculados de 0,1413, 0,1293, 0,2399, 0,1878, 0,2240, 0,2167 e 0,2659, respectivamente. 47H4 também demonstrou ligar-se à linhagem de célula-B tumoral de Daudi. Todos os resultados são mostrados como medidos através de intensidade fluorescente geométrica
 20 média (GMFI) de coloração. Esses dados mostram que a proteína CD19 é expressada na superfície das linhagens de células tumorais originárias de célula B e que os anticorpos HuMAb anti-CD19 21D4, 21D4a, 47G4, 5G7, 5G7-N19K, 5G7-N19Q, 3C10 e 13F1 ligam-se a CD19 expressado na
 25 superfície da célula.

Exemplo 5 : Análise de Ligação Scatchard dos Anticorpos Humanos Anti-CD19 21D4 e 47G4 a Células-B Tumorais de Raji

Células de Raji foram obtidas de ATCC (Registro #CCL-86)
 30 e crescidas em RPMI contendo soro fetal bovino a 10% (FBS). As células foram lavadas duas vezes com RPMI contendo FBS a 10% a 4°C e as células foram ajustadas em 4×10^7 células/ml em meios RPMI contendo soro fetal bovino a 10% (tampão de ligação contendo 24 mM Tris pH 7,2,
 35 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 2 mM glicose, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, BSA 0,1%). Placas Millipore (MAFB NOB) foram revestidas com leite em pó desnatado em água a 1% e

armazenadas a 4°C da noite para o dia. As placas foram lavadas com tampão de ligação e 25 µl de anticorpo não marcado (excesso de 1000 vezes) em tampão de ligação foram adicionados para controlar as cavidades numa placa de filtro de fibra de vidro de 96 cavidades Millipore (ligação não-específica NSB). Vinte e cinco microlitros de tampão isoladamente foram adicionados à cavidade de controle de ligação máxima (ligação total). Foram adicionados vinte e cinco microlitros de concentrações variadas de anticorpo ¹²⁵I-anti-CD19 21D4 ou 47G4 e 25 µl de células de Raji (4 x 10⁷ células/ml) em tampão de ligação. As placas foram incubadas durante 2 horas a 200 RPM num agitador a 4°C. No final da incubação, as placas Millipore foram lavadas três vezes com 0,2 ml de tampão de lavagem frio (24 mM Tris pH 7,2, 500 mM NaCl, 2,7mM KCl, 2 mM glicose, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,1% BSA). Os filtros foram removidos e contados num contador gama. A avaliação da ligação de equilíbrio foi conduzida utilizando-se parâmetros de ligação de sítio único com o software Prism (San Diego, CA). Ao utilizar o ensaio de ligação Scatchard acima, o K_D do anticorpo para células de Raji foi de aproximadamente 2,14 nM para 21D4 e 12,02 nM para 47G4.

Exemplo 6 : Internalização de Anticorpo Monoclonal Anti-CD19.

HuMAbs Anti-CD19 foram testados quanto à sua capacidade de internalização em células-B tumorais de Raji ou células de CHO humanas transfectadas com CD19 utilizando um ensaio de internalização Hum-Zap. O Hum-Zap testa a internalização de um anticorpo humano primário através de ligação de um anticorpo secundário com afinidade pela IgG humana conjugada à toxina saporina.

A linhagem celular CHO-CD19 ou a linhagem de célula-B tumoral de Raji foi inoculada a 1,0x10⁴ células/cavidade em cavidades de 100 µl da noite para o dia ou no dia seguinte durante um período de duas horas. O anticorpo anti-CD19 21D4 ou 47G4 foram adicionados às cavidades a

uma concentração inicial de 30 nM e titulado em diluições
seriais de 1:3. Um anticorpo de controle de isótipo
humano que é não-específico para CD19 foi utilizado como
controle negativo. O Hum-Zap (Advanced Targeting Systems,
5 IT-22-25) foi adicionado a uma concentração de 11nM e as
placas foram deixadas incubar durante 48 horas. As placas
foram então pulsadas com 1,0 μ Ci de ^{3} H-timidina por 18-24
horas, coletadas e lidas num Contador de Cintilação Top
Count (Packard Instruments). Os resultados de
10 internalização em células tumorais CHO-CD19 e B são
mostrados nas Figuras 26A e 26B, respectivamente. Somente
o HuMAb 47G4 foi testado em células CHO-CD19. O anticorpo
anti-CD19 47G4 mostrou uma redução dependente de
concentração de anticorpo na incorporação de ^{3} H-timidina
15 em células CHO-CD19. Tanto os HuMAbs 21D4 como 47G4
mostrou uma redução dependente de concentração de
anticorpo na incorporação de ^{3} H-timidina em células-B
tumorais de Raji. Esses dados demonstram que os
anticorpos anti-CD19 21D4 e 47G4 internalizam em células
20 transfectantes CHO-CD19 e células B tumorais expressando
CD19.

Exemplo 7 : Avaliação de Morte de Células de um Anticorpo Anti-CD19 conjugado a Toxina

Neste exemplo, os anticorpos monoclonais anti-CD19
25 conjugados a uma toxina foram testados quanto a sua
capacidade de matar linhagens celulares CD19+ num ensaio
de incorporação de timidina.

Um anticorpo monoclonal anti-CD19 foi conjugado a uma
toxina através de um ligante, tal como um ligante de
30 peptidila, hidrazona ou dissulfeto. A linhagem celular de
Raji expressando CD19+ foi inoculada em $2,5 \times 10^4$
células/cavidades durante 3 horas. Um conjugado de
anticorpo anti-CD19-toxina foi adicionado às cavidades a
uma concentração inicial de 30 nM e titulado em diluições
35 seriais 1:3. Um anticorpo de controle de isótipo que é
não-específico para CD19 foi usado como controle
negativo. O excesso de dez vezes do anticorpo frio, 21D4a

ou um anticorpo de controle de isótipo, é usado para competição de ligação. As placas foram deixadas incubar durante 69 horas. As placas foram então pulsadas com 1,0 μ Ci de ^3H -timidina durante 24 horas, colhidas e lidas num

5 Contador de Cintilação Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Os resultados são mostrados na Figura 27 juntamente com os valores EC50. Esses dados demonstram que o anticorpo anti-CD19 21D4 mata as células B tumorais de Raji.

10 Exemplo 8 : Tratamento de Tumores de célula B *in vivo* utilizando Anticorpos Anti-CD19

Neste Exemplo, camundongos SCID implantados com tumores cancerosos de célula B foram tratados *in vivo* com anticorpos anti-CD19 desnudos ou anticorpos anti-CD19

15 conjugados à toxina para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos sobre o crescimento do tumor.

Os anticorpos anti-CD19 conjugados a toxina foram preparados conforme acima descrito. Diversos camundongos imuno-deficientes combinados que não possuíam linfócitos

20 B e T funcionais foram usados no estudo de malignidades de célula B. As células da linhagem de célula-B tumoral de Ramos foram injetadas intravenosamente. Os camundongos foram tratados com 19,6 mg/kg de anticorpo anti-CD19 conjugado a toxina ou 30 mg/kg de anticorpo anti-CD19

25 desnudo. Um anticorpo de controle de isótipo ou tampão de formulação foi usado como controle negativo. Os animais foram dosados através de injeção intraperitoneal com aproximadamente 200 μ l de PBS contendo anticorpo ou veículo. O conjugado anticorpo-toxina foi injetado em

30 dose única no dia 7, ao passo que o anticorpo desnudo foi injetado como modelo profilático em dose única no dia 1 ou como um modelo de tratamento nos dias 7, 14 e 21. Os camundongos foram monitorados diariamente quanto à paralisia em pata traseira por aproximadamente 6 semanas.

35 Utilizando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor calculado. Os

camundongos foram submetidos à eutanásia ao apresentarem paralisia em pata traseira.

Conforme documentado por análise Kaplan-Meier (Figura 28), houve um aumento no tempo médio de sobrevivência mediante tratamento com anticorpos anti-CD19 conjugados à toxina, anticorpos anti-CD19 desnudos administrados profilaticamente ou anticorpos anti-CD19 administrados como regime de tratamento. O maior aumento no tempo médio de sobrevivência mostrado foi através de tratamento profilático utilizando o anticorpo anti-CD19 desnudo.

A alteração no peso corporal foi também medida e calculada como alteração percentual de peso. Os dados são mostrados na Figura 29. Durante um período de 30 dias, houve uma alteração de aumento líquido no peso corporal com um anticorpo conjugado à toxina e uma alteração de redução líquida no peso corporal com anticorpo e toxina (não conjugado). Houve uma alteração de aumento líquido no peso corporal com o regime de tratamento utilizando o anticorpo anti-CD19 desnudo profilático ou o anticorpo anti-CD19.

Exemplo 9 : Tratamento de Modelo de Xenoenxerto Tumoral utilizando Anticorpos Anti-CD19 desnudos

Camundongos implantados com um tumor de linfoma foram tratados *in vivo* com anticorpos anti-CD19 desnudos para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos sobre o crescimento do tumor.

Células ARH-77 (leucemia de linfoblasto B humano; Registro ATCC No. CRL-1621) e de Raji (linfoma de Burkitt de linfócito B humano; Registro ATCC No. CCL-86) foram expandidas *in vitro* utilizando procedimentos laboratoriais padrão. Camundongos CB17.SCID machos (Taconic, Hudson, NY) com 6-8 semanas de vida foram implantados subcutaneamente no flanco direito com 5×10^6 ARH-77 ou células de Raji em 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por camundongo. Os camundongos foram pesados e medidos quanto aos tumores tridimensionalmente utilizando um calibrador eletrônico duas vezes por semana após

implantação. Os volumes de tumor foram calculados como peso x largura x comprimento. Os camundongos com tumores ARH-77 tendo em média 80 mm³ ou tumores de Raji tendo em média 170 mm³ foram randomizados em grupos de tratamento.

5 Os camundongos foram dosados intraperitonealmente com veículo PBS, anticorpo de controle de isótipo ou HuMAb 2 H5 anti-CD19 desnudo no dia 0. Os camundongos foram submetidos à eutanásia quando os tumores atingiram a meta(ponto máximo) (2000 mm³). Os resultados são
10 mostrados na Figura 30A (tumores ARH-77) e 30B (tumores de Raji). O anticorpo anti-CD19 21D4 desnudo ampliou o tempo médio para atingir o volume de ponto máximo (meta) de tumor (2000 mm³) e retardou a progressão de crescimento do tumor. Assim, o tratamento com um
15 anticorpo anti-CD19 isoladamente possui um efeito inibitório *in vivo* sobre o crescimento do tumor.

Exemplo 10 : Produção de HuMAbs Não-Fucosilados

Os anticorpos com quantidades reduzidas de resíduos fucosila demonstraram aumentar a capacidade de ADCC do
20 anticorpo. Neste exemplo, o HuMAb anti-CD19 21D4 foi produzido com ausência de resíduos fucosila.

A linhagem celular CHO Ms704-PF, onde falta o gene fucosiltransferase, FUT 8 (Biowa, Inc., Princeton, NJ) foi eletroporada com um vetor que expressa as cadeias
25 pesada e leve do anticorpo 21D4. Os clones resistentes a fármaco foram selecionados através de crescimento em meios CHO Ex-Cell 325-PF (JRH Biosciences, Lenexa, KS) com 6 mM L-glutamina e 500 µg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os clones foram identificados quanto à
30 expressão de IgG através de ensaio ELISA padrão.

Caracterização de Oligossacarídeo de MAbs através de CELIF

A análise comparativa de oligossacarídeos N-ligados derivados de anticorpos anti-CD19 de uma linhagem celular
35 fucosilante CHO e amostras de anticorpo monoclonal anti-CD19 derivado de Ms704-PF foi realizada através de eletroforese capilar com fluorescência induzida a laser

(cLIF) (Chen and Evangelista (1998) Electrophoresis 15:1892). Os oligossacarídeos N-ligados do anticorpo purificado foram liberados das amostras de IgG (100 µg) através de incubação da noite para o dia das amostras com 12,5 mU PMGaseF (Prozyme) a 40° C. Sob as condições utilizadas, os glicanos N-ligados da porção Fc de HuMAb 21D4 expressada em células CHO fucosilantes e não-fucosilantes foram liberados. Após precipitação com etanol para remover a proteína MAb, o sobrenadante contendo os glicanos foi secado através de centrifugação a vácuo e resuspenso em 19 mM de 8-aminopireno-1,3,6-trissulfonato (APTS) (Beckman) sob condições de aminação redutiva leve onde a desalilação e perda de resíduos fucose foi minimizada (ácido acético a 15% e 1M ciaboborohidreto de sódio em THF (Sigma)). A reação marcadora de glicano foi deixada prosseguir da noite para o dia a 40°C seguida de diluição de 25 vezes da amostra em água. Os glicanos marcados com APTS foram aplicados a eletroforese capilar com fluorescência induzida a laser num sistema P/ACE MDQ CE (Beckman) com polaridade reversa, utilizando um capilar revestido com N-CHO com diâmetro interno de 50 µm (Beckman) com 50 cm de comprimento efetivo. As amostras foram injetadas a pressão (8 seg) e a separação foi realizada a 20°C utilizando um Tampão Gel de Separação de Carboidratos (Beckman) a 25 kV durante 20 minutos. As separações foram monitoradas utilizando um sistema de detecção de fluorescência induzida a laser (Beckman) com um laser de íon argônio de 3 mW e comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 520 nm. (Ma e Nashabeh (1999) Anal.Chem.71:5185). Diferenças no perfil de oligossacarídeo foram observadas entre o anticorpo obtido da linhagem celular fucosilante em comparação com a linhagem celular Ms704-PF, consistente com uma ausência de resíduos fucose nos anticorpos anti-CD19 derivados de Ms704-PF.

Análise de Monossacarídeo através de HPLC com HPAE-PAD

Amostras de IgG (200 μ g) foram submetidas à hidrólise ácida utilizando ou TFA 2N (para calcular açúcares neutros) ou HCl 6N (para calcular amino açúcares) a 100°C durante 4 horas. As amostras foram secadas através de centrifugação a vácuo à temperatura ambiente e reconstituídas em 200 μ l de água antes da análise através de HPAE-PAD (Dionex). Os monossacarídeos foram separados utilizando uma coluna CarboPac PA10 4 x 250 mm com pré-coluna Amino Trap e Borate Trap (Dionex). Os procedimentos foram seguidos de acordo com a Nota Técnica 53 Dionex. A identidade de pico de monossacarídeo e a abundância relativa foram determinadas utilizando padrões de monossacarídeo (Dionex).

O anticorpo anti-CD19 21D4 não-fucosilado foi também testado utilizando um kit de ensaio de focalização isoelétrica capilar padrão (Beckman Coulter). O ensaio retornou valores pI observados de pH 8,45 para 21D4 fucosilado, 8,44 e 8,21 para 21D4a fucosilado, e 8,52 e 8,30 para os anticorpos 21D4 não-fucosilados.

Exemplo 11 : Avaliação de Atividade de ADCC de Anticorpo Anti-CD19

Neste exemplo, os anticorpos monoclonais anti-CD19 fucosilados e não-fucosilados foram testados quanto à capacidade de matar células CD19+ na presença de células efetoras através de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) num ensaio de citotoxicidade de fluorescência.

O anticorpo monoclonal anti-CD19 humano não-fucosilado 21D4 foi preparado conforme descrito acima. As células efetoras humanas foram preparadas a partir de sangue total como segue. As células mononucleares de sangue periférico humano foram purificadas de sangue total heparinizado através de separação com Ficoll-paque padrão. As células foram resuspensas em meios RPMI1640 contendo FBS 10% (meios de cultura) e 200 U/ml de IL-2 humana e incubadas da noite para o dia a 37°C. No dia seguinte, as células foram coletadas e lavadas uma vez em

meios de cultura e resuspensas a 2×10^7 células/ml. As células alvo CD19+ foram incubadas com reagente BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a $2,5 \mu\text{l}$ BATDA por 1×10^6 células alvo/mL em meios de cultura suplementados com 2,5 mM probenecid (meios de ensaio) durante 20 minutos a 37°C . As células alvo foram lavadas quatro vezes em PBS com 20 mM HEPES e 2,5 mM probenecid, agitadas por rotação e trazidas para um volume final de 1×10^5 células/ml em meios de ensaio.

10 A linhagem celular de CD19+ ARH-77 (leucemia de linfoblasto B humano; Registro ATCC No. CRL-1621) foi testada quanto à ADCC específica de anticorpo ao anticorpo monoclonal anti-CD19 humano fucosilado e não-fucosilado 21D4 utilizando a análise de emissão de fluorescência Delfia como segue. A linhagem celular alvo ARH77 ($100 \mu\text{l}$ de células alvo marcadas) foi incubada com $50 \mu\text{l}$ de células efetoras e $50 \mu\text{l}$ de anticorpo 21D4 ou 21D4 não-fucosilado. Uma meta para a relação de efetor de 1:50 foi usada em todos os experimentos. Um controle de isótipo IgG1 humano foi usado como controle negativo. Após rotação de pulso a 2100 rpm e uma hora de incubação a 37°C , os sobrenadantes foram coletados, aplicada rotação rápida novamente e $20 \mu\text{l}$ de sobrenadante foram transferidos para uma placa de fundo plano, na qual $180 \mu\text{l}$ de solução Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) foram adicionados e lida num leitor de placa Fusion Alpha TRF (Perkin Elmer). A % lise foi calculada como segue: $(\text{liberação da amostra} - \text{liberação espontânea} * 100) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea})$, onde a liberação espontânea é a fluorescência das cavidades que contém somente células alvo e a liberação máxima é a fluorescência das cavidades contendo células alvo e foram tratadas com Lysol 3%. A % de lise específica de citotoxicidade celular para a linhagem celular ARH-77 é mostrada na Figura 31. A linhagem celular ARH-77 expressando CD19+ mostrou citotoxicidade mediada por anticorpo com o anticorpo anti-CD19 HuMAb 21D4 e uma

porcentagem aumentada de lise específica associada com a forma não-fucosilada do anticorpo anti-CD19 21D4. Esses dados demonstram que os anticorpos anti-CD19 HuMAb não-fucosilados mostram citotoxicidade específica aumentada a células expressando CD19+.

Exemplo 12 : Termoestabilidade de Anticorpos Monoclonais Anti-CD19 através de Calorimetria Diferencial Exploratória

A estabilidade térmica dos anticorpos monoclonais anti-CD19 foi comparada utilizando análise calorimétrica de suas temperaturas de fusão.

As medições calorimétricas de temperaturas de fusãoTM foram realizadas numa plataforma de microcalorímetro diferencial exploratório VP-Capillary DSC combinado com um amostrador automático (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). O volume celular da amostra é de 0,144 ml. Os dados de desnaturação sobre as formas glicosiladas e desglicosiladas dos anticorpos foram obtidos aquecendo-se as amostras, a uma concentração de 2,3 μ M, de 30 a 95°C a uma taxa de 1°C/min. As amostras de proteína estavam presentes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a um pH de 7,4. O mesmo tampão foi utilizado na célula de referência para obter a capacidade térmica molar através de comparação. Os termogramas observados foram corrigidos por linha de referência e os dados normalizados analisados com base num modelo de 2 estados, utilizando o software Origin V7.0. Os dados constam da Tabela 2.

Tabela 2 - Medição de estabilidade térmica de anticorpos anti-CD19

Clone	Termoestabilidade T_m 1 (°C)
21D4	68,7
21D4a	69,7
5G7	68,5
5G7 IgG4	67,4
13F1 IgG4'	68,4
46E8	66,4
47G4	67,2

Exemplo 13 - Avaliação de Sítios de Glicosilação

O anticorpo anti-CD19 HuMAb 5G7 demonstrou ter um padrão

de glicosilação N-X-S/T na região variável através de análise de sequência. A presença de um sítio de sequência ligado a N (N-X-S/T) é necessária porém não suficiente para a adição de carboidrato a MAb. Ou seja, é possível ter uma sequência N-X-S/T que não adicione um carboidrato devido à ligação de proteína e acessibilidade do solvente. A confirmação de um sítio de glicosilação na região variável de 5G7 foi examinada através de LC-MS e análise Western.

10 A Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (LC-MS) é uma ferramenta padrão para determinar a massa de uma proteína, tal como um anticorpo. Antes da análise, os oligossacarídeos N-ligados dos HuMAbs anti-CD19 5G7 e 13F1 foram liberados de amostras de IgG (100 µg) através de incubação da noite para o dia com 12,5 mU PNGaseF (Prozyme) a 40°C. Sob as condições utilizadas, os glicanos N-ligados da porção Fc dos HuMAbs foram liberados. Para o clone 5G7, observamos duas massas em alta abundância; uma delas (49.855 Da) correspondia à massa prevista após digestão de PNGaseF para remover açúcares na região constante no sítio N-ligado conservado (N297) e uma segunda massa (52.093 Da) consistente com a adição de carboidrato num segundo sítio. Descobrimos que os glicanos da região Fab não são removidos pela digestão de PNGaseF; portanto, esses dados corroboram a presença de carboidratos na região variável do clone 5G7. Para o clone 13F1, a massa observada combinava com a massa prevista da sequência de proteína sem carboidratos ligados.

30 Para confirmar o resultado acima, concluímos um ensaio Western Blot em fragmentos Fab dos clones 5G7 e 13F1, com um método de coloração carboidrato-específico. Os fragmentos Fab e Fc foram produzidos adicionando-se 1,25 µg de papaína ativada a 25 µg de amostras IgG contendo 1 mM de cisteína. As amostras foram incubadas a 40°C durante 4 horas e as reações interrompidas com 30 mM iodoacetamida. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE

Tris-Glicina 4-20% seguido de eletroblotting sobre membrana PVDF. A coloração específica de carboidrato do "blot" foi conduzida utilizando-se o Kit de Coloração de Glicoproteína GelCode (Pierce) após protocolo sugerido
5 pelo fabricante. Os resultados detectaram glicosilação de Fab no anticorpo 5G7, mas não no anticorpo 13F1. Esses resultados mostraram que o anticorpo 5G7 é glicosilado na região Fab.

Conforme discutido acima, o anticorpo monoclonal anti-
10 CD19 5G7 contém uma região variável com um sítio de glicosilação. Uma vez que os sítios de glicosilação na região variável podem levar a um aumento na imunogenicidade do anticorpo ou a valores pK alterados devido à ligação a antígeno alterada, pode ser vantajoso
15 mutar a seqüência de padrão de glicosilação N-X-S/T na região variável para reduzir a glicosilação. Utilizando técnicas padrão de biologia molecular, a seqüência do anticorpo 5G7 foi modificada para alterar a seqüência N-I-S iniciando na posição 19 até K-I-S (5G7-N19K) ou Q-I-S
20 S(5G7-N19Q).

Exemplo 14 : Estabilidade de Anticorpos Monoclonais Anti-CD19 através de Espectroscopia de Fluorescência

A estabilidade de anticorpos monoclonais anti-CD19 foi comparada medindo-se o ponto médio de desnaturação
25 química através de espectroscopia de fluorescência.

As medições de fluorescência de desnaturação química foram conduzidas num SPEX Fluorolog 3.22 com um leitor de placas Micromax (SPEX, Edison, NJ). As medições foram realizadas em amostras de anticorpo que tinham sido
30 deixadas durante 24 horas para equilibrar em 16 concentrações diferentes de cloridrato de guanidínio em tampão PBS. As medições foram feitas em placas de 384 cavidades de baixo volume, pretas de superfície não-ligante (Corning, Acton, MA) e requereram 2 μ M de
35 anticorpo num volume de cavidade de 12 μ l. A fluorescência foi excitada a 280 nm e os espectros de emissão foram medidos entre 300 e 400 nm. A velocidade de

varredura foi de 1 segundo por nm e as fendas foram ajustadas em 5 nm de passagem de banda. Um branco tampão foi realizado utilizando PBS e automaticamente subtraído dos dados. Os dados constam da Tabela 3.

5 Tabela 3 - Estabilidade de Fluorescência de anticorpos Anti-CD19

Clone	Ponto Médio Não-Revelação (M)	Pico agregação (M)
21D4	3,01	
21D4a	2,97	
5G7	2,91	
5G7 IgG4	2,63	
27F3	2,77	
13F1 IgG4	2,58	2,29
46E8	2,43	2,16
47G4	1,68	

Exemplo 15 : Tratamento de Tumores de Célula B de Raji *in vivo* utilizando Anticorpos anti-CD19

10 Neste exemplo, camundongos SCID implantados com tumores cancerosos de célula B são tratados *in vivo* com anticorpos anti-CD19 desnudos ou anticorpos anti-CD19 conjugados a toxina para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos sobre o crescimento do tumor.

15 Os anticorpos anti-CD19 conjugados a toxina foram preparados conforme acima descrito. Diversos camundongos imunodeficientes combinados (SCID) sem linfócitos B e T funcionais foram usados no estudo de malignidades de célula B. As linhagens de células-B tumorais de Raji foram injetadas subcutaneamente. Os camundongos foram
20 tratados com 30 mg/kg de anticorpo ou 0,3 μ mol/kg de conjugado anticorpo-toxina. Um anticorpo de controle de isótipo ou o tampão de formulação foi usado como controle negativo. Os animais foram dosados através de injeção intraperitoneal com aproximadamente 200 μ l de PBS
25 contendo anticorpo ou veículo. O anticorpo foi injetado como dose única (SD) no dia 0 ou como dose repetida (RD) nos dias 0, 7 e 14. Os camundongos foram monitorados diariamente quanto ao crescimento do tumor utilizando um calibrador eletrônico; os tumores foram medidos

tridimensionalmente (altura x largura x comprimento/2) e o volume do tumor calculado. Os camundongos foram submetidos à eutanásia quando os tumores atingiram a meta (ponto máximo) (2000 mm³) ou quando apresentaram mais de 20% de perda de peso. Os resultados constam da Figura 32. Em cada caso, o anticorpo anti-CD19 exibe volumes menores de tumor em comparação com os controles negativos, com os anticorpos conjugados a toxina mostrando volumes menores de tumor do que o tratamento com anticorpo desnudo.

10 A alteração no peso corporal foi também medida e calculada como alteração percentual no peso. Os resultados são mostrados na Figura 33. Os resultados mostraram uma alteração de redução líquida no peso corporal com os anticorpos conjugados a toxina e aumento líquido no peso com veículo ou com anticorpos desnudos.

Exemplo 16 : Estudos de Célula B em Macacos Cinomolgos

Neste exemplo, macacos cinomolgos foram injetados intravenosamente com anticorpo anti-CD19 parental ou anticorpos anti-CD19 não-fucosilados (nf). As contagens absolutas de leucócitos e os subconjuntos de leucócito foram determinados após dosagem e comparados com valores pré-dose.

As amostras de sangue colhidas de macacos cinomolgos foram coradas com anticorpo CD19 parental ou anticorpo anti-CD19 nf e analisadas através de FACS utilizando métodos padrão. As células B de todos os macacos incluídas no estudo tiveram coloração positiva com anticorpos anti-CD19 tanto parentais como nf. Dois macacos e duas macacas foram incluídos em cada grupo. As amostras de sangue foram colhidas no dia 7 e na pré-dosagem. Uma injeção intravenosa lenta de bolus numa veia safena foi realizada e os animais dosados com 1 mg/kg de anticorpo anti-CD19 parental ou nf. As amostras de sangue foram colhidas 24 horas, 48 horas, 72 horas e nos dias 7, 14, 21 e 28 após dosagem. As amostras de sangue foram colhidas para determinação de PK, hematologia e citometria de fluxo. Em cada ponto de tempo, os seguintes

antígenos de superfície celular foram monitorados no sangue: CD2+/CD20+(todos linfócitos), CD20+(linfócitos B), CD3+(Linfócitos T), CD3+/CD4+(linfócitos T-auxiliares("helper")), CD3+/CD8+(linfócitos citotóxicos T), CD3-/CD16+ (células NK), CD3-/CD14+ (monócitos).

A Figura 34 mostra a alteração no número de células positivas CD20 quando comparadas com os valores médios do dia 7 e pré-dose. Embora o anticorpo anti-CD19 parental tenha induzido uma redução de 55% no número de células B CD20 positivas após 24 horas, o anticorpo não-fucosilado produziu uma inibição mais profunda, baixando as contagens de célula B em aproximadamente 90%. No grupo anti-CD19 nf, as contagens de célula B permaneceram neste nível nos dias 2, 3 e no dia 7 pós-tratamento enquanto o anticorpo parental parece começar a retornar à linha de referência. A Figura 35 mostra a % alteração da linha de referência para células CD20 positivas para cada um dos macacos individuais. Todos os quatro macacos tratados com anticorpo anti-CD19 nf mostraram uma queda mais significativa na % de células positivas CD20 quando comparados com o anticorpo anti-CD19. Juntos esses dados implicam que o anticorpo anti-CD19 nf é mais eficaz na depleção de células B circulantes quando comparado com o anticorpo parental

Exemplo 17 : Estudos Imunoistoquímicos de Anticorpos Anti-CD19

Para avaliar os perfis de ligação a tecido de anti-CD19 HuMab, 21D4 conjugado a FITC (21D4-FITC, F:P=4) e 21D4 não-fucosilado (nf21D4) (nf21D4-FITC; F:P=3) foram examinados num painel de tecidos humanos normais (não neoplásicos), incluindo o baço, amígdala, intestino delgado, cerebelo, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim (1-2 amostra/cada) bem como neoplasmas de célula B, leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular, linfoma de zona marginal, linfoma da célula do manto, e linfoma difuso de grandes células B (1-2 amostra/cada). Os anticorpos 21D4 não-fucosilados foram preparados conforme

acima descrito. Hu-IgG1 conjugado a FITC (Hu-IgG1-FITC) foi usado como anticorpo de controle de isótipo.

Tecidos normais e de linfoma congelados e embebidos em OCT foram adquiridos da Cooperative Human Tissue Network

5 (Philadelphia, PA) ou National Disease Research Institute (Philadelphia, PA). Cortes por criostato de 5 μ m foram

fixados com acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente e armazenados a -80°C até o uso. A

10 imunocoloração de peroxidase indireta usando EnVision+System (Dako, Carpinteria, CA) foi conduzida após nosso protocolo de rotina. Resumidamente, as lâminas

foram lavadas com PBS (Sigma, St. Louis, MO) duas vezes, e então incubadas com bloco de peroxidase fornecido no

15 sistema Dako EnVision+System durante 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com bloco de proteína Dako suplementada com gamaglobulinas

humanas a 1% e 1 mg/ml de IgG humana termicamente agregada durante 20 minutos para bloquear os sítios de

20 ligação não-específica. Posteriormente, os anticorpos primários (21D4-FITC e nf21D4 FITC a 0,4 ou 2 μ g/ml) ou o

controle de isótipo (Hu-IgG1-FITC a 0,4 ou 2 μ g/ml) foram aplicados sobre os cortes e incubados durante 1 hora.

Após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-FITC de camundongo (20 μ g/ml) durante

25 30 minutos. Após outras três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o polímero IgG anti-camundongo conjugado a peroxidase fornecido no sistema Dako

EnVision+System durante 30 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas conforme acima citado e reagidas

30 com solução de substrato DAB-cromógeno fornecido no sistema Dako EnVision+System durante 6 minutos. As

lâminas foram então lavadas com água deionizada, contracóradas com hematoxilina Mayer (Dako),

desidratadas, clareadas e montadas com Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) após procedimento histológico

35 de rotina.

A coloração específica tanto com 21D4-FITC como com

nf21D4-FITC foi observada em tecidos linfóides ou ricos em linfóide (baço, amígdala e intestino delgado) e tecidos de linfoma. No baço e amígdala, a coloração forte específica foi principalmente distribuída nas regiões de
 5 célula B, ou seja, nódulos linfáticos do baço, zona do manto e centro germinal da amígdala. No intestino delgado, a forte imunoreatividade específica foi principalmente localizada na placa de Peyer ou agregados linfóides, bem como a coloração de fraca a forte em
 10 linfócitos difusos em lâmina própria da mucosa. A coloração forte também foi observada em células tumorais de linfoma folicular e linfoma de zona marginal, bem como a coloração de moderada a forte em leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B e linfoma de
 15 célula do manto.

Em tecidos normais do cerebelo, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim, nenhuma coloração significativa foi observada quando corados com 21D4-FITC ou nf21D4-FITC exceto alguma coloração em células linfóides focais ou
 20 agregados em tecidos do pulmão e rins. Além disso, esses tecidos foram corados em concentrações mais altas de até 10 $\mu\text{g/ml}$. De forma similar, nenhuma coloração específica foi observada se comparada com o anticorpo de controle de isótipo.

25 As comparações de 21D4-FITC e nf21D4-FITC exibiram padrões similares de coloração em todos os tecidos. A coloração específica estava saturada ou próxima da saturação a 0,4 $\mu\text{g/ml}$. Porém, a intensidade de coloração com 21D4-FITC é de cerca de 0,5-1 grau mais forte do que
 30 a de nf21D4-FITC, o que, em parte, pode ser devido à relação F:P mais alta de 21D4-FITC (4 vs. 3).

Exemplo 18 : Avaliação de Exterminação de Células de um Anticorpo Anti-CD19

Neste exemplo, os anticorpos monoclonais anti-CD19
 35 isoladamente ou conjugados a uma toxina foram testados quanto à sua capacidade de exterminar linhagens celulares CD19+ num ensaio de incorporação de timidina.

Um anticorpo monoclonal anti-CD19 foi conjugado a uma toxina via ligante, tal como um ligante de peptidila, hidrazona ou dissulfeto. As linhagens celulares de Raji ou de SU-DHL-6 expressando CD19+ foram inoculadas em 5 1×10^4 células/cavidade. O anticorpo anti-CD19 isoladamente ou um conjugado anticorpo anti-CD19-toxina foi adicionado às cavidades a uma concentração inicial de 30 nM e titulado em diluições seriadas 1:3 para 8 diluições. Um anticorpo de controle de isótipo que é não 10 específico para CD19 foi usado como controle negativo. As placas foram deixadas incubar durante 69 horas. As placas foram então pulsadas com $0,5 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina durante 24 horas, colhidas e lidas num contador de cintilação Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Os resultados 15 são mostrados na Figura 36 juntamente com os valores EC_{50} . A Figura 36A mostra o anticorpo desnudo sobre células de Raji. A Figura 36B mostra o anticorpo desnudo sobre células SU-DHL-6. A Figura 36C mostra o anticorpo anti-CD19 conjugado a toxina sobre células SU-DHL-6. 20 Esses dados demonstram que o anticorpo anti-CD19 21D4 liga-se a e extermina células tumorais B de Raji e possui um nível inesperadamente alto de exterminação celular sobre células SU-DHL-6.

Exemplo 19: Estudos de Depleção de Célula B

25 Para determinar se os anticorpos anti-CD19 eram capazes de depleção de células B, foi montado um ensaio de depleção de célula B em sangue total. Sangue total humano foi adquirido de AllCells Inc. (Berkeley, CA) e entregue no mesmo dia à temperatura ambiente. Dois ml de sangue total foram incubados na 30 ausência ou presença de 1-30 mg/ml dos anticorpos indicados, ou PBS como o grupo não tratado. A mistura sangue-anticorpo foi incubada da noite para o dia a 37°C com CO_2 a 5%. No dia do experimento, o sangue foi lisado 35 duas vezes com tampão de lise RBC à razão de 1:10 através de incubação por 10 minutos seguida de centrifugação. Após a segunda rotação, as pelotas de célula foram

lavadas uma vez com tampão FACS (PBS mais cálcio e magnésio com FBS a 2% e versene a 20%) seguido de coloração FACS com anticorpo anti-CD3 (catálogo Becton Dickinson # 555332) como os marcadores de célula T e anticorpo anti-CD22 (catálogo Becton Dickinson # 340708) como marcadores de célula B utilizando os protocolos de citometria de fluxo padrão. As células foram incubadas em gelo durante 20 minutos antes das lavagens finais e resuspensas em 5 mg/ml de solução de iodeto de propídio (cat# P4864 da Sigma) em tampão FACS. Os dados foram coletados através de citometria de fluxo utilizando um sistema FASCalibur e software CellQuest da Becton Dickinson, e analisados através do software FlowJo utilizando "gating" do tamanho do linfócito. A alteração percentual foi calculada determinando-se a % de células B positivas no grupo não tratado menos a % de células B positivas no grupo tratado com anticorpo dividido pela % de células B positivas no grupo não tratado vezes 100. Os resultados constam da Tabela 4. De um doador de sangue sadio, 8,7% das células B permaneceram no sangue após incubação da noite para o dia (sem anticorpo). A incubação do sangue total com 30 mg/ml de controle positivo Rituxan levou a uma depleção de 46% no número de células B em comparação ao grupo não tratado e sem anticorpo. O grupo tratado com anticorpo não-fucosilado (nf) e anticorpo anti-CD19 apresentou um efeito pronunciado sobre a depleção de células B, inibindo as células B em ~40%. O anticorpo parental teve um efeito modesto sobre as contagens de células B.

Tabela 4 : Depleção de células B de sangue total

Amostra	% Positivo (CD22)	% Alteração
Sem anticorpo	8,7	-
Controle de isótipo	7,5	14,2
Rituxan	4,7	46,3
Anti-CD19 mAb parental	7,0	20,0
Nf anti-CD19 mAb	5,2	40,5

SUMÁRIO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA
1	V _H a.a.21D4 & 21D4a	41	V _K CDR1 a.a.5G7
2	V _H a.a.47G4	42	V _K CDR1 a.a.13F1
3	V _H a.a.27F3	43	V _K CDR1 a.a.46E8
4	V _H a.a.3C10	44	V _K CDR2 a.a.21D4&21D4a
5	V _H a.a.5G7	45	V _K CDR2 a.a.47G4
6	V _H a.a.13F1	46	V _K CDR2 a.a.27F3
7	V _H a.a.46E8	47	V _K CDR2 a.a.3C10
8	V _K a.a.21D4	48	V _K CDR2 a.a.5G7
9	V _K a.a.21D4a	49	V _K CDR2 a.a.13F1
10	V _K a.a.47G4	50	V _K CDR2 a.a.46E8
11	V _K a.a.27F3	51	V _K CDR3 a.a.21D4
12	V _K a.a.3C10	52	V _K CDR3 a.a.21D4a
13	V _K a.a.5G7	53	V _K CDR3 a.a.47G4
14	V _K a.a.13F1	54	V _K CDR3 a.a.27F3
15	V _K a.a.46E8	55	V _K CDR3 a.a.3C10
16	V _H CDR1 a.a.21D4&21D4a	56	V _K CDR3 a.a.5G7
17	V _H CDR1 a.a.47G4	57	V _K CDR3 a.a.13F1
18	V _H CDR1 a.a.27F3	58	V _K CDR3 a.a.46E8
19	V _H CDR1 a.a.3C10	59	V _H n.t.21D4&21D4a
20	V _H CDR1 a.a.5G7	60	V _H n.t.47G4
21	V _H CDR1 a.a.13F1	61	V _H n.t.27F3
22	V _H CDR1 a.a.46E8	62	V _H n.t.3C10
23	V _H CDR2 a.a.21D4&21D4a	63	V _H n.t.5G7
24	V _H CDR2 a.a.47G4	64	V _H n.t.13F1
25	V _H CDR2 a.a.27F3	65	V _H n.t.46E8
26	V _H CDR2 a.a.3C10	66	V _K n.t.21D4
27	V _H CDR2 a.a.5G7	67	V _K n.t.21D4a
28	V _H CDR2 a.a.13F1	68	V _K n.t.47G4
29	V _H CDR2 a.a.46E8	69	V _K n.t.27F3
30	V _H CDR3 a.a.21D4&21D4a	70	V _K n.t.3C10
31	V _H CDR3 a.a.47G4	71	V _K n.t.5G7
32	V _H CDR3 a.a.27F3	72	V _K n.t.13F1
33	V _H CDR3 a.a.3C10	73	V _K n.t.46E8
34	V _H CDR3 a.a.5G7	74	linha germinal VH 5-51 a.a.
35	V _H CDR3 a.a.13F1	75	linha germinal VH 1-69 a.a.
36	V _H CDR3 a.a.46E8	76	linha germinal VK L18 a.a.
37	V _K CDR1 a.a.21D4&21D4a	77	linha germinal VK A27 a.a.
38	V _K CDR1 a.a.47G4	78	linha germinal VK L15 a.a.
39	V _K CDR1 a.a.27F3	79	CD19 a.a.
40	V _K CDR1 a.a.3C10	80	linha germinal JH4b
		81	linha germinal JH5b
		82	linha germinal JH6b
		83	linha germinal JH6b
		84	linha germinal JK2
		85	linha germinal JK3
		86	linha germinal JK1
		87	linha germinal JK2

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> MEDAREX, INC.

<120> "ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-CD19, MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS EXPRESSANDO CD19 E MÉTODO PARA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B NUM INDIVÍDUO".

<130> 04280/2203058-WO0

<140>

<141>

<150> 60/804,083

<151> 2006-06-06

<150> 60/748,956

<151> 2005-12-08

<150> 60/692,531

<151> 2005-06-20

<160> 87

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Arg	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85						90				95		
Ala	Arg	His	Val	Thr	Met	Ile	Trp	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Phe	Trp	Gly
		100						105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Asp	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Gln	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90				95		

Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Asp Ser Tyr Tyr Gly Met Gly
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Thr	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Ile	Pro	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Asn	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25				30			
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50				55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Val	Ser	Met	Ile	Trp	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Gly Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Gly Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35					40					45				
Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25				30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35					40					45				
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Arg
			85						90					95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```
<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 13
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
   1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
   20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
   35             40             45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
   65             70             75             80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp
   85             90             95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
   100             105

```

```
<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 14
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
          20             25             30
```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Ser Trp Ile Gly

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

● <400> 17

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Tyr Trp Ile Ala

1 5

● <210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Tyr Thr Ile Asn

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

● <400> 21

Asn Tyr Trp Ile Ala

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asn Tyr Trp Ile Ala

1 5

● <210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Gln Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

His Val Thr Met Ile Trp Gly Val Ile Ile Asp Phe

1

5

10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro

1

5

10

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Met	Gly	Val
1				5					10					15

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10				

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly	Val	Ser	Met	Ile	Trp	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Val
1				5					10		

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Met	Gly	Val
1				5					10					15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Met	Gly	Val
1				5					10				15	

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10		

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

● <213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

● Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1

5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

● <400> 49

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

● <210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp Thr

1

5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

● <400> 57

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His Thr

1

5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His Thr

1

5

● <210> 59

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (363)

<400> 59

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48

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

1

5

10

15

```

tct ctg aag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt agc agc agc 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ser Ser
      20              25              30
tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
ggg atc atc tat cct gat gac tct gat acc aga tac agt ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
      50              55              60
caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agg acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Arg Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85              90              95
gcg aga cat gtt act atg att tgg gga gtt att att gac ttc tgg ggc 336
Ala Arg His Val Thr Met Ile Trp Gly Val Ile Ile Asp Phe Trp Gly
      100             105             110
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca                               363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 60

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 60

```

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1              5              10              15

```

```

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gac tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa gga ctt gag tgg atg 144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca aca aac tac gca cag cag ttc 192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Gln Phe
      50              55              60
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
atg gag ctg agc agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
gcg aga gaa gca gta gct gcg gac tgg tta gac ccc tgg ggc cag gga 336
Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly
      100             105             110
acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 61

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<400> 61

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
      1              5              10              15

```

```

tct ctg aag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt acc agc tac 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
      20              25              30

tgg atc gcc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
      50              55              60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85              90              95

gcg aga cag ggg tat agc agt ggc tgg gac tcc tac tac ggt atg ggc 336
Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Asp Ser Tyr Tyr Gly Met Gly
      100             105             110

gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 62

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (369)

<400> 62

```

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1              5              10              15

```

```

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30
act atc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
Thr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
gga ggg atc att cct atc ttt ggt ata cct aac tac gca cag aag ttc 192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50              55              60
cag ggt aga gtt acg att acc gcg gac gaa tcc acg aac aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
atg gag ctg agc agc ctg aga gct gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
gcg aga gcc agt ggt ggg agc gcg gac tat tcc tac ggt atg gac gtc 336
Ala Arg Ala Ser Gly Gly Ser Ala Asp Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Val
      100              105              110
tgg ggc caa ggg acc gcg gtc acc gtc tcc tca 369
Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 63

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (363)

<400> 63

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
      1              5              10              15

```

```

tct ctg aac atc tcc tgt aag ggt tct gga tac agc ttt acc agc tac 96
Ser Leu Asn Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
      20              25              30

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
      50              55              60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc aac acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
      65              70              75              80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85              90              95

gcg aga ggg gtt tct atg att tgg gga gtt att atg gac gtc tgg ggc 336
Ala Arg Gly Val Ser Met Ile Trp Gly Val Ile Met Asp Val Trp Gly
      100             105             110

caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 64

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(372)

<400> 64

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
      1              5              10              15

```

```

tct ctg cag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac acc ttt acc aac tac 96
Ser Leu Gln Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
      20              25              30

tgg atc gcc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
      50              55              60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80

cta cag tgg agc ggc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Gly Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85              90              95

gcg aga cag gga tat agc agt ggc tgg cgc tcc tac tac ggt atg ggc 336
Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly
      100             105             110

gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 65

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(372)

<400> 65

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
      1              5              10              15

```

```

tct ctg cag atc tcc tgt aag ggt tct gga tac acc ttt acc aac tac 96
Ser Leu Gln Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
      20              25              30
tgg atc gcc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
      50              55              60
caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
cta cag tgg agc ggc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Gly Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
      85              90              95
gcg aga cag gga tat agc agt ggc tgg cgc tcc tac tac ggt atg ggc 336
Ala Arg Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Arg Ser Tyr Tyr Gly Met Gly
      100              105              110
gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 66

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 66

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1              5              10              15

```

```

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
      20              25              30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65              70              75              80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac ccg tac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
      85              90              95
act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100              105

```

<210> 67

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 67

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1              5              10              15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
      20              25              30

```

```

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65              70              75              80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cca ttc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe
      85              90              95
act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
      100              105

```

<210> 68

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 68

```

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      1              5              10              15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
      20              25              30
tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35              40              45

```

```

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50                      55                      60
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
      65                      70                      75                      80
cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca cga 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg
                      85                      90                      95
ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 324
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
      100                      105

```

<210> 69

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 69

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1                      5                      10                      15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
      20                      25                      30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35                      40                      45
tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

```

```

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                      70                      75                      80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac ccg tac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
                      85                      90                      95
act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100                      105

```

<210> 70

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 70

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                      5                      10                      15
gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20                      25                      30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35                      40                      45
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50                      55                      60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                      70                      75                      80

```

```

gaa gat ttt gca act tac tac tgc caa cag tat aag aga tac ccg tac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Arg Tyr Pro Tyr
      85              90              95
act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100              105

```

<210> 71

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 71

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1              5              10              15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
      20              25              30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65              70              75              80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac ccg tgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp
      85              90              95

```

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 72

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 72

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cct cac 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His
 85 90 95
 act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 73
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 73

```

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
   1             5             10             15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
           20           25           30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
           65           70           75           80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cct cac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His
           85           90           95
act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 74
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		

Ala Arg

<210> 75

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		

Ala Arg

<210> 76

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35				40						45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	
				85					90					95	

<210> 77

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25				30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35				40						45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	
				85					90					95	

<210> 78

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
		35				40						45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	
				85					90				95		

<210> 79

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Met	Pro	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Pro	Met
1				5					10					15	
Glu	Val	Arg	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Val	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Gly	Asp
			20						25				30		
Asn	Ala	Val	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Asp	Gly	Pro	Thr	Gln
		35				40						45			
Gln	Leu	Thr	Trp	Ser	Arg	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu
	50					55					60				
Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Ile	His	Met	Arg	Pro	Leu	Ala	Ile
65					70					75				80	
Trp	Leu	Phe	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Gln	Gln	Met	Gly	Gly	Phe	Tyr	Leu
				85					90				95		

Cys	Gln	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Glu	Lys	Ala	Trp	Gln	Pro	Gly	Trp	Thr		
			100					105					110				
Val	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Phe	Arg	Trp	Asn	Val	Ser	Asp		
		115					120					125					
Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Lys	Asn	Arg	Ser	Ser	Glu	Gly	Pro		
	130					135					140						
Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Pro	Lys	Leu	Tyr	Val	Trp	Ala		
145					150					155					160		
Lys	Asp	Arg	Pro	Glu	Ile	Trp	Glu	Gly	Glu	Pro	Pro	Cys	Leu	Pro	Pro		
				165				170					175				
Arg	Asp	Ser	Leu	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Thr	Met	Ala	Pro		
			180					185					190				
Gly	Ser	Thr	Leu	Trp	Leu	Ser	Cys	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Ser		
		195					200					205					
Arg	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Thr	His	Val	His	Pro	Lys	Gly	Pro	Lys	Ser		
	210					215					220						
Leu	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Arg	Pro	Ala	Arg	Asp	Met	Trp		
225					230				235					240			
Val	Met	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Ala		
				245				250					255				
Gly	Lys	Tyr	Tyr	Cys	His	Arg	Gly	Asn	Leu	Thr	Met	Ser	Phe	His	Leu		
			260				265						270				
Glu	Ile	Thr	Ala	Arg	Pro	Val	Leu	Trp	His	Trp	Leu	Leu	Arg	Thr	Gly		
		275					280					285					
Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ile	Phe	Cys	Leu		
	290					295					300						
Cys	Ser	Leu	Val	Gly	Ile	Leu	His	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Val	Leu	Arg		
305					310					315				320			
Arg	Lys	Arg	Lys	Arg	Met	Thr	Asp	Pro	Thr	Arg	Arg	Phe	Phe	Lys	Val		
				325				330					335				
Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Gly	Pro	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu		
			340					345					350				
Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg	Ala	Gln	Arg	Trp	Ala		
		355					360					365					
Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Pro	Ser	Tyr	Gly	Asn	Pro	Ser	Ser	Asp		
	370					375					380						

Val	Gln	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Pro	Pro	Gly	Val	Gly
385					390					395					400
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Glu	Gly	Tyr	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu
				405				410						415	
Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Asp	Ser	Asn	Leu	Gly	Gln	Asp	Gln	Leu
			420					425					430		
Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Glu	Asp	Glu	Pro	Leu	Gly
		435						440				445			
Pro	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala	Glu	Ser	Tyr	Glu	Asn	Glu
		450						455				460			
Asp	Glu	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Met	Asp	Phe	Leu	Ser
465					470					475					480
Pro	His	Gly	Ser	Ala	Trp	Asp	Pro	Ser	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly
				485					490					495	
Ser	Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro	Gln
			500					505					510		
Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Asn	His	Glu	Glu	Asp	Ala
		515						520				525			
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn	Met	Asp	Asn	Pro	Asp	Gly	Pro	Asp	Pro	Ala	Trp
		530					535				540				
Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Gly	Thr	Trp	Ser	Thr	Arg				
545					550					555					

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 82

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 1 5 10 15
 Ser Ser

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

● <400> 86

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10



REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de:

5 (a) ligar-se a CD19 humano com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos; e

(b) ligar-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o anticorpo ser não fucosilado.

3. Anticorpo monoclonal isolado, ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de o anticorpo fazer competição cruzada para ligar-se a CD19 com um anticorpo de referência, sendo que o anticorpo:

15 (a) liga-se a CD19 humano com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos; e

(b) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi, e onde o anticorpo de referência compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo de SEQ ID

20 NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7; e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, e 15.

4. Anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender uma região variável de cadeia pesada que é derivada de um gene V_H 5-51 humano ou um gene V_H 1-69 humano e uma região variável de cadeia leve que é derivada de um gene V_{K18} , V_{K27} ou um gene V_{K15} humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a

30 CD19.

5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma sequência de CDR1 de região variável de cadeia pesada selecionada de um grupo consistindo de SEQ ID NO:

35 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22;

(b) uma sequência de CDR2 de região variável de cadeia pesada selecionada de um grupo consistindo de SEQ ID NO:

23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29;

(c) uma sequência de CDR3 de região variável de cadeia pesada selecionada de um grupo consistindo de SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36;

5 (d) uma sequência de CDR1 de região variável de cadeia leve selecionada de um grupo consistindo de SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43;

(e) uma sequência de CDR2 de região variável de cadeia leve selecionada de um grupo consistindo de SEQ ID NO:

10 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50; e

(f) uma sequência de CDR3 de região variável de cadeia pesada selecionada de um grupo consistindo de SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58.

6. Anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou
15 fragmento ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender:

uma região variável de cadeia pesada que compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3; e uma região variável de cadeia leve que compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3,

20 onde:

(a) a sequência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 e suas modificações

25 conservativas;

(b) a sequência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58 e suas modificações

30 conservativas;

(c) o anticorpo liga-se a CD19 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos; e

(d) liga-se a células-B tumorais de Raji e Daudi.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 6,
35 caracterizado pelo fato de a sequência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreender uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de sequências

de aminoácido SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29, e suas modificações conservativas; e a sequência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de
5 sequências de aminoácido de SEQ ID NOS: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, e suas modificações conservativas.

8. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de a sequência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreender uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de sequências de aminoácido de SEQ ID NOS: 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, e suas modificações conservativas; e a sequência CDR1 da região variável de cadeia leve compreender uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de
15 sequências de aminoácido de SEQ ID NOS: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, e suas modificações conservativas.

9. Anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender:

20 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15;
25

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a CD19.

10. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a
30 sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8.

11. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

35 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a

seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 9.

12. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

13. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:3; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 11.

14. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 12.

15. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 13.

16. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

17. Anticorpo monoclonal isolado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 15.

18. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo, a porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, ligado a um agente terapêutico.

5 19. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de o agente terapêutico ser uma citotoxina ou um isótopo radioativo.

20. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de codificar o anticorpo, ou a porção ligante
10 ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1.

21. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de aminoácido, conforme definida na reivindicação 20.

15 22. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 21.

23. Método para preparar um anticorpo anti-CD19, caracterizado pelo fato de compreender expressar o
20 anticorpo na célula hospedeira, conforme definida na reivindicação 54, e isolar o anticorpo da célula hospedeira.

24. Método para inibir o crescimento de células tumorais expressando CD19, caracterizado pelo fato de compreender
25 contatar as células com o anticorpo, ou a porção ou fragmento ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, numa quantidade eficaz para inibir o crescimento das células tumorais.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de ditas células tumorais serem
30 malignidades de célula B.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de dita malignidade de célula B ser linfoma não-Hodgkin ou um linfoma de célula do manto.

35 27. Método para depleção de células B num indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo o anticorpo anti-CD19, conforme definido na

reivindicação, numa quantidade eficaz para depletar células B do indivíduo.

Anti-CD19 21D4 e 21D4a VH

Segmento V : 5-51

Segmento D : 3-10

Segmento J : JH4b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     K I S C K G S G Y S F S S S W I G W
      AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT AGC AGC AGC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q M P G K G L E W M G I I Y P D
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGT CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217    D K S I R T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGG ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A M Y Y C A R H V T M I W G V I I
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GTT ACT ATG ATT TGG GGA GTT ATT ATT

                                CDR3
                                ~~~~~
325    D F W G Q G T L V T V S S
      GAC TTC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

FIG. 1A

Anti-CD19 21D4 VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK2

```
      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1     GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   A   L   A   W   Y
55     GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A   S   S   L
109    CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163    GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      F   N   S   Y   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I   K
271    TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
```

FIG. 1B

Anti-CD19 21D4a VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK3

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

                                CDR2
                                ~~~~~
163    E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

                                CDR3
                                ~~~~~
271    F N S Y P F T F G P G T K V D I K
TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

```

FIG. 1C

Anti-CD19 47G4 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 6-19

Segmento J : JH5b

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

CDR1

K V S C K D S G G T F S S Y A I S W
AAG GTC TCC TGC AAG GAC TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

CDR2

V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGA CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

CDR2

F G T T N Y A Q Q F Q G R V T I T A
TTT GGT ACA ACA AAC TAC GCA CAG CAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGT CTG AGA TCT GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R E A V A A D W L D P
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA GCA GTA GCT GCG GAC TGG TTA GAC CCC

W G Q G T L V T V S S
TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 2A

Anti-CD19 47G4 VK

Segmento V : A27

Segmento J : JK3

```

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
-----
A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
-----
Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

                                CDR2
-----
R A T G I P D R F S G S G S G T D F
AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
-----
T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                                CDR3
-----
Q Y G S S R F T F G P G T K V D I K
CAG TAT GGT AGC TCA CGA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
```

FIG. 2B

Anti-CD19 27F3 VH

Segmento V : 5-51

Segmento D : 6-19

Segmento J : JH6b

```
1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55      K I S C K G S G Y S F T S Y W I A W
      AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109     V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163     D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217     D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271     T A M Y Y C A R Q G Y S S G W D S Y
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGG TAT AGC AGT GGC TGG GAC TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325     Y G M G V W G Q G T T V T V S S
      TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG. 3A

Anti-CD19 27F3 VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK2

```
1      A  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55     V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  S  S  A  L  A  W  Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109    Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

                                CDR2
                                ~~~~~
163    E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217    L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

                                CDR3
                                ~~~~~
271    F  N  S  Y  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K
TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
```

FIG. 3B

Anti-CD19 3C10 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 1-26

Segmento J : JH6b

```
1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     K V S C K A S G G T F S S Y T I N W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT ACT ATC AAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATT CCT ATC

                                CDR2
                                ~~~~~
163    F G I P N Y A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GGT ATA CCT AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGT AGA GTT ACG ATT ACC GCG

217    D E S T N T A Y M E L S S L R A E D
      GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A V Y Y C A R A S G G S A D Y S Y
      ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCG AGA GCC AGT GGT GGG AGC GCG GAC TAT TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325    G M D V W G Q G T A V T V S S
      GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC GCG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG. 4A

Anti-CD19 3C10 VK

Segmento V : L15

Segmento J : JK2

```
      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55   GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109  CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163  CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Y K R Y P Y T F G Q G T K L E I K
271  TAT AAG AGA TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
```

FIG. 4B

Anti-CD19 5G7 VH

Segmento V : 5-51

Segmento D : 3-10

Segmento J : JH6b

```
1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     N I S C K G S G Y S F T S Y W I G W
      AAC ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217    D K S I N T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AAC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A M Y Y C A R G V S M I W G V I M
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GTT TCT ATG ATT TGG GGA GTT ATT ATG

                                CDR3
                                ~~~~~
325    D V W G Q G T T V T V S S
      GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG. 5A

11/45

Anti-CD19 5G7 VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK1

```

1      A  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55      V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  S  S  A  L  A  W  Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109     Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

CDR2
~~~~~
163     E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217     L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

CDR3
~~~~~
271     F  N  S  Y  P  W  T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K
TTT AAT AGT TAC CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

FIG. 5B

Anti-CD19 13F1 VH

Segmento V : 5-51

Segmento D : 6-19

Segmento J : JH6b

```
1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55      Q I S C K G S G Y T F T N Y W I A W
      CAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ACC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109     V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163     D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217     D K S I S T A Y L Q W S G L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTA CAG TGG AGC GGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271     T A M Y Y C A R Q G Y S S G W R S Y
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGA TAT AGC AGT GGC TGG CGC TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
325     Y G M G V W G Q G T T V T V S S
      TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG. 6A

Anti-CD19 13F1 VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK2

```
1      A  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55      V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  S  S  A  L  A  W  Y
      GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109     Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L
      CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163     E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
      GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217     L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271     F  N  S  Y  P  H  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K
      TTT AAT AGT TAC CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
```

FIG. 6B

Anti-CD19 46E8 VH

Segmento V : 5-51

Segmento D : 6-19

Segmento J : JH6b

```
      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
1    GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
      Q I S C K G S G Y T F T N Y W I A W
55   CAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ACC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
109  GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
      D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
163  GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

      D K S I S T A Y L Q W S G L K A S D
217  GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTA CAG TGG AGC GGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
      T A M Y Y C A R Q G Y S S G W R S Y
271  ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGA TAT AGC AGT GGC TGG CGC TCC TAC

                                CDR3
                                ~~~~~
      Y G M G V W G Q G T T V T V S S
325  TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIG. 7A

Anti-CD19 46E8 VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK2

```
      A  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
1    GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      V  T  I  T  C  R  A  S  Q  G  I  S  S  A  L  A  W  Y
55    GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  D  A  S  S  L
109   CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
      E  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T
163   GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
      F  N  S  Y  P  H  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K
271   TTT AAT AGT TAC CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
```

FIG. 7B

Anti-CD19 21D4, 21D4a, região VH

Linha germinal 5-51 21D4 VH 21D4a VH	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G	W
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CDR1																																				
Linha germinal 5-51 21D4 VH 21D4a VH	V	R	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	I	I	Y	P	G	D	S	D	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CDR2																																				
Linha germinal 5-51 21D4 VH 21D4a VH	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	S	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CDR3																																				
Linha germinal JH4b 21D4 VH 21D4a VH	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
(JH4b)																																				
(JH4b)																																				

FIG. 8

Anti-CD19 47G4 região VH

Linha germinal 1-69 47G4 VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W - - - - - CDR1 - - - - - D - - - - -
Linha germinal 1-69 47G4 VH	V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A - - - - - CDR2 - - - - - T - - - - - Q - - - - -
Linha germinal 1-69 Linha germinal JH5b 47G4 VH	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R - - - - - CDR3 - - - - - W F D P - - - - - E A V A A D - L - -
Linha germinal JH5b 47G4 VH	W G Q G T L V T V S S - - - - - (JH5b) - - - - -

FIG. 9

Anti-CD19 27F3 região VH	
Linha germinal 5-51 27F3 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W - - - - - CDR1 - - - - - A -
Linha germinal 5-51 27F3 VH	V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A - - - - - CDR2 - - - - - -
Linha germinal 5-51 Linha germinal JH6b 27F3 VH	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R - - - - - CDR3 - - - - - Y Y -
Linha germinal JH6b 27F3 VH	Y G M D V W G Q G T T V T V S S - - - - - (JH6b) - - - - -

FIG. 10

Anti-CD19 3C10 região VH

Linha germinal 1-69 3C10 VH	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W - - - - - CDR1 - - - - - T - N -
Linha germinal 1-69 3C10 VH	V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A - - - - - CDR2 - - - - - I P - - - - -
Linha germinal 1-69 Linha germinal JH6b 3C10 VH	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R - - - - - N - - - - - A - - - - - A \$ G G S A D - S - - - - - - CDR3 - - - - - Y Y Y
Linha germinal JH6b 3C10 VH	G M D V W G Q G T T V T V S S - - - - - A - - - - - (JH6b)

FIG. 11

Anti-CD19 5G7 região VH

Linha germinal 5-51
5G7 VH

Linha germinal 5-51
5G7 VH

V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A

CDR2

Linha germinal 5-51	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R		<u>CDR3</u>
Linha germinal JH6b	- - - - N -	M	
5G7 VH	- - - - N -	G V S M I W G V I	

Linha germinal JH6b
5G7 VH

FIG. 12

Anti-CD19 13F1 região VH

Linha germinal 5-51
13F1 VH

Linha germinal 5-51
13F1 VH

	CDR3
Linha germinal 5-51	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
Linha germinal JH6b	
13F1 VH	- - - - - G - - - - - Q Q Y S S G W R S -

Linha germinal JH6b
13F1 VH

FIG. 13

Anti-CD19 46E8 região VH

Linha germinal 5-51 46E8 VH	E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G W - - - - - Q - - - - - T - - - - - N - - - - - A -
Linha germinal 5-51 46E8 VH	V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A - - - - - CDR2 - - - - -
Linha germinal 5-51 Linha germinal JH6b46E8 VH	D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R - - - - - G - - - - - Q Q Y S S G W R S - - - - - - CDR3 - - - - - Y Y
Linha germinal JH6b 46E8 VH	Y G M D V W G Q G T T V T V S S - - - - - G - - - - - (JH6b)

FIG. 14

Anti-CD19 21D4 região VK

Linha germinal L18 21D4 VK	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S - - - - - CDR1
Linha germinal L18 21D4 VK	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F - - - - - CDR2
Linha germinal L18 21D4 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S - - - - - CDR3
Linha germinal L18 Linha germinal JK2 21D4 VK	Y P Y T F G Q G T K L E I K - - - - - (JK2)

FIG. 15

Anti-CD19 21D4a região VK

Linha germinal L18 21D4a VK	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S ----- CDR1
Linha germinal L18 21D4a VK	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F ----- CDR2
Linha germinal L18 21D4a VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S ----- CDR3
Linha germinal L18 Linha germinal JK3 21D4a VK	Y P F T F G P G T K V D I K ----- (JK3)

FIG. 16

Anti-CD19 47G4 região VK

Linha germinal A27
47G4 VK E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S ^{CDR1}

Linha germinal A27
47G4 VK S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R ^{CDR2}

Linha germinal A27
47G4 VK F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G ^{CDR3}

Linha germinal A27
Linha germinal JK3
47G4 VK S S F T F G P G T K V D I K (JK3)

FIG. 17

Anti-CD19 27F3 região VK

Linha germinal L18 27F3 VK A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S CDR1

Linha germinal L1827F3 VK A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V E S R F CDR2

Linha germinal L1827F3 VK S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N N S CDR3

Linha germinal L18 27F3 VK Y P Y T F G Q G T K L E I K (JK2)

FIG. 18

Anti-CD19 3C10 região VK

Linha germinal L15 3C10 VK	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
	CDR1
Linha germinal L15 3C10 VK	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
	CDR2
Linha germinal L15 3C10 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
	CDR3
Linha germinal L15 Linha germinal JK2 3C10 VK	Y P Y T F G Q G T K L E I K (JK2)

FIG. 19

Anti-CD19 5G7 região VK

Linha germinal L18 5G7 VK	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1
Linha germinal L18 5G7 VK	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F	CDR2
Linha germinal L18 5G7 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N N	CDR3
Linha germinal L18 Linha germinal JK1 5G7 VK	Y P W T F G Q G T K V E I K	(JK1)

FIG. 20

Anti-CD19 13F1 região VK

Linha germinal L18
13F1 VK

Linha germinal L18
13F1 VK

Linha germinal L18
13F1 VK

Linha germinal L18
 Linha germinal JK2
 13F1 VK (JK2)

FIG. 21

Anti-CD19 46E8 região VK

Linha germinal L18
 46E8 VK

Linha germinal L18
46E8 VK

Linha germinal L18
46E8 VK

Linha germinal L18
Linha germinal JK2
46E8 VK
(JK2)

FIG. 22

31/45

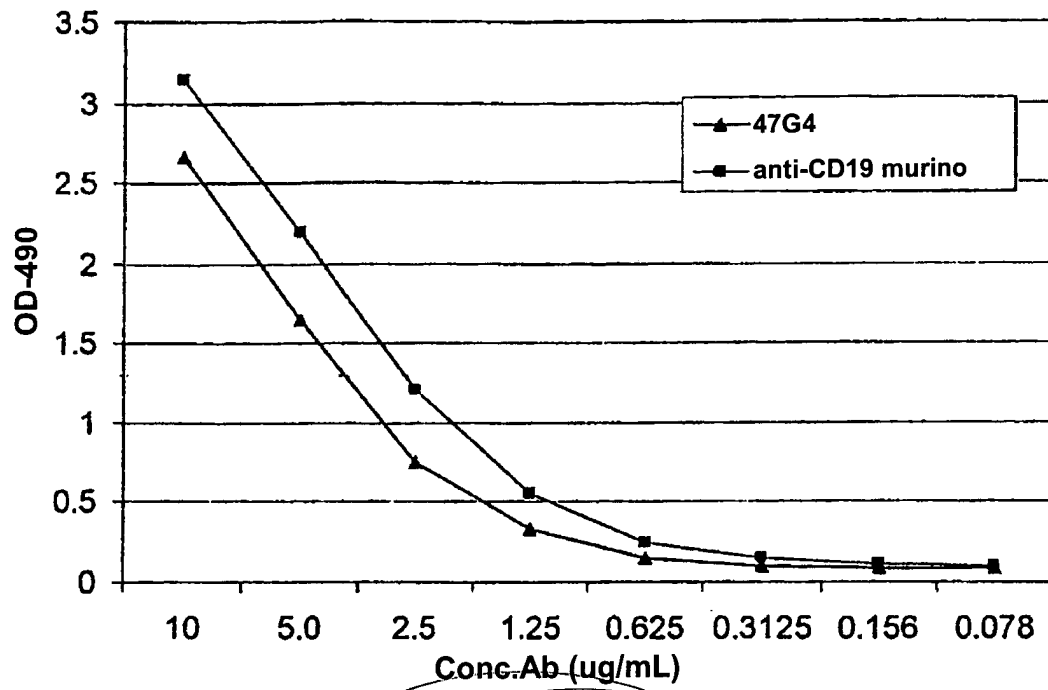
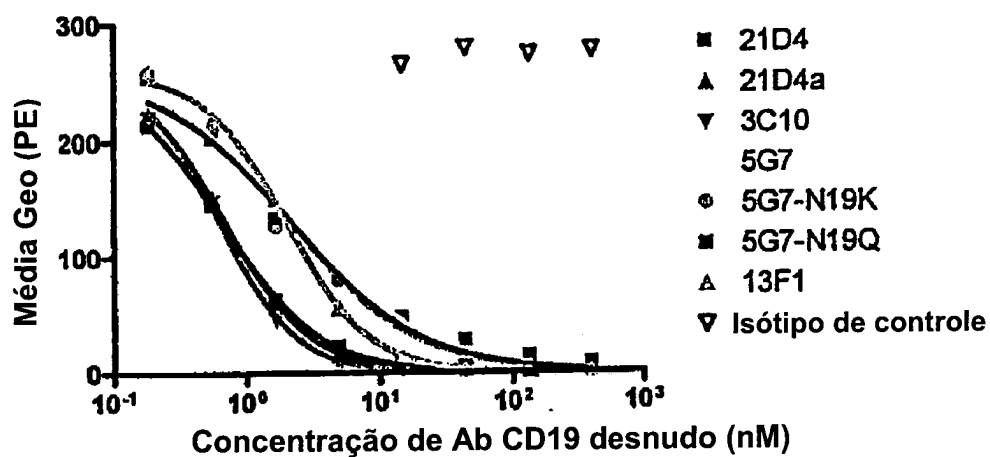


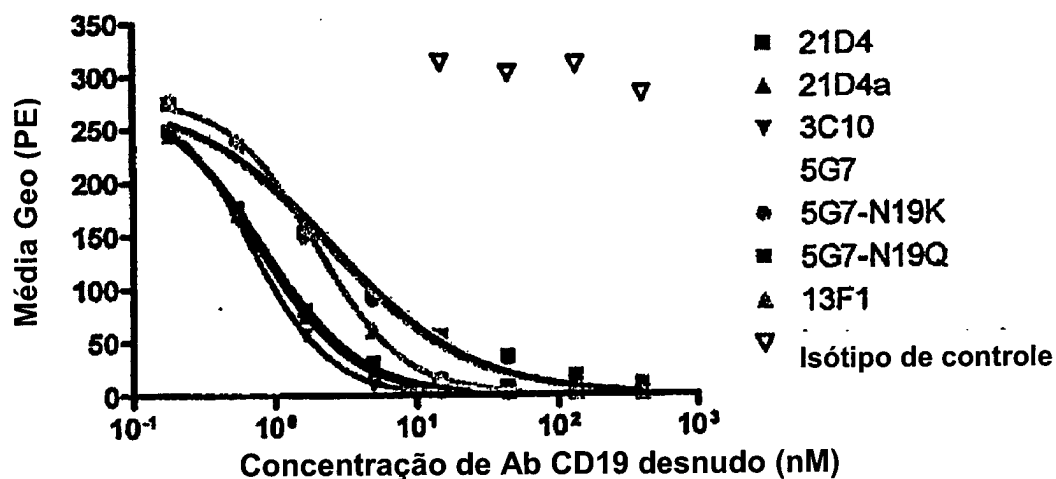
FIG. 23

21D4-biotinilado (0,3 µg/mL)
Competição FACS em Células de Raji



	21D4	21D4a	3C10
EC50	0.6550	0.6938	0.6278
5G7	5G7-N19K	5G7-N19Q	13F1
2.454	2.100	2.161	1.987

21D4a-biotinilado (0,3 µg/mL)
Competição FACS em Células de Raji



	21D4	21D4a	3C10	
EC50	0.8320	0.7673	0.6862	
	5G7	5G7-N19K	5G7-N19Q	13F1
	2.849	2.383	2.629	1.967

FIG. 24

33/45

FACS CD19 EM CÉLULAS CHO-CD19

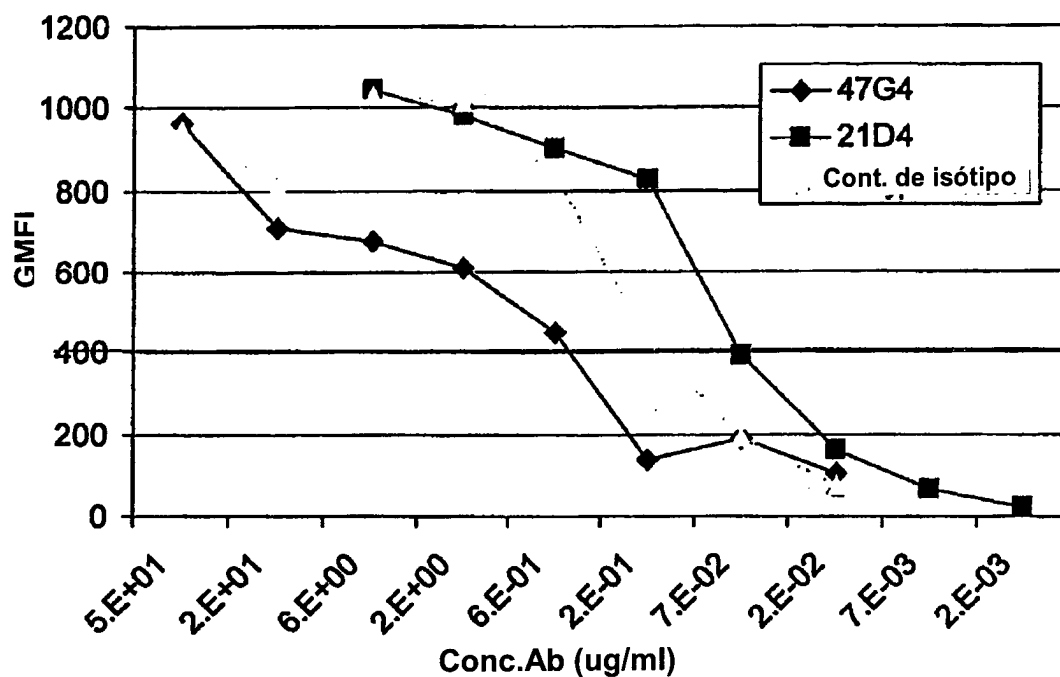


FIG. 25A

FACS CD19 EM CÉLULAS B DE DAUDI

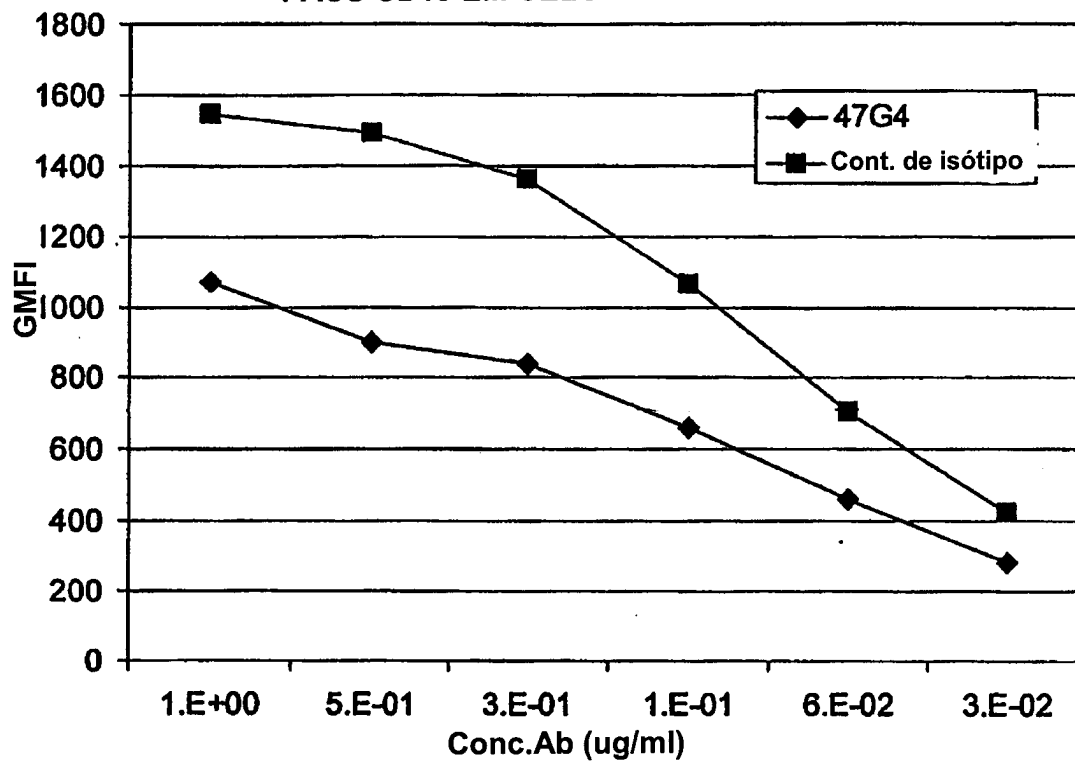


FIG. 25B

34/45

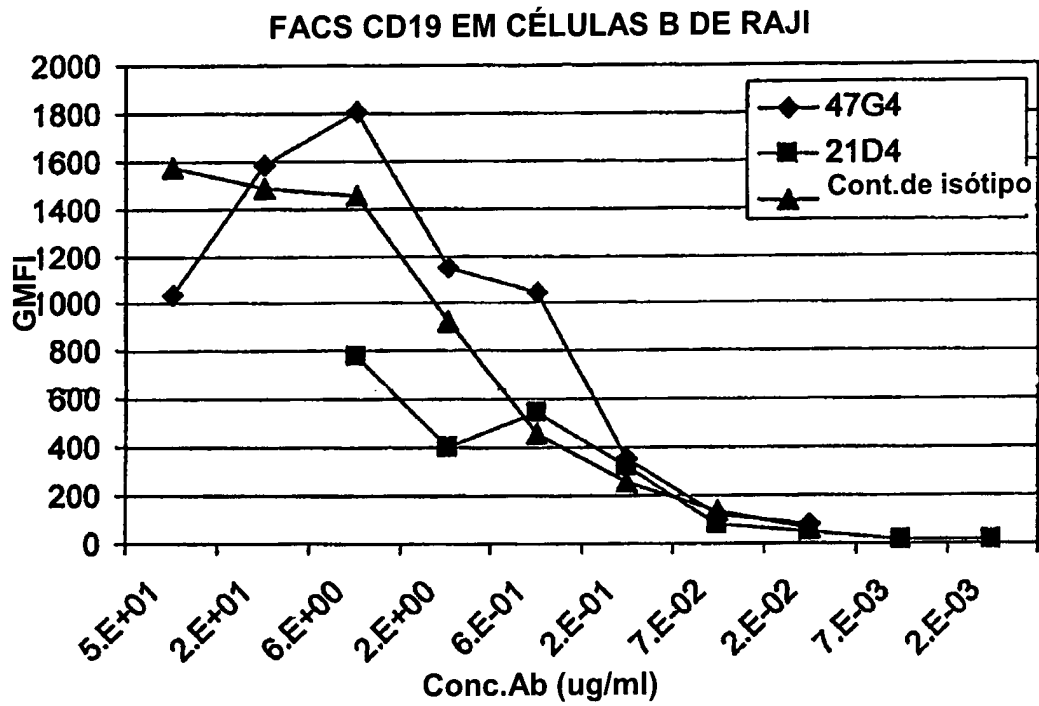


FIG. 25C

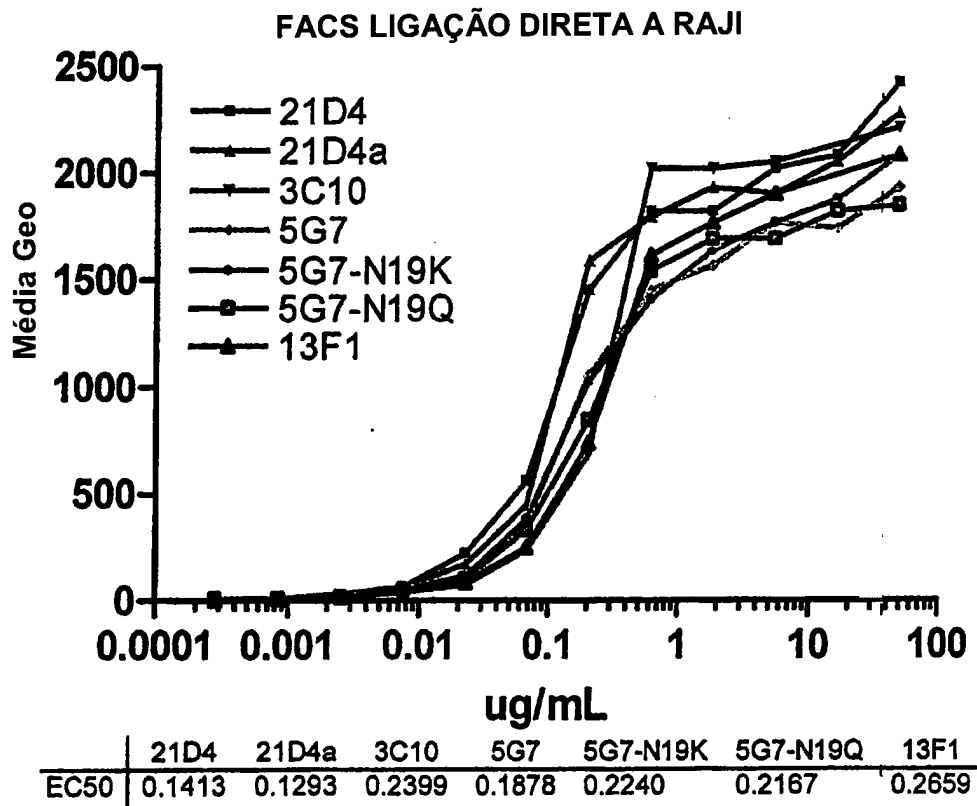


FIG. 25D

35/45

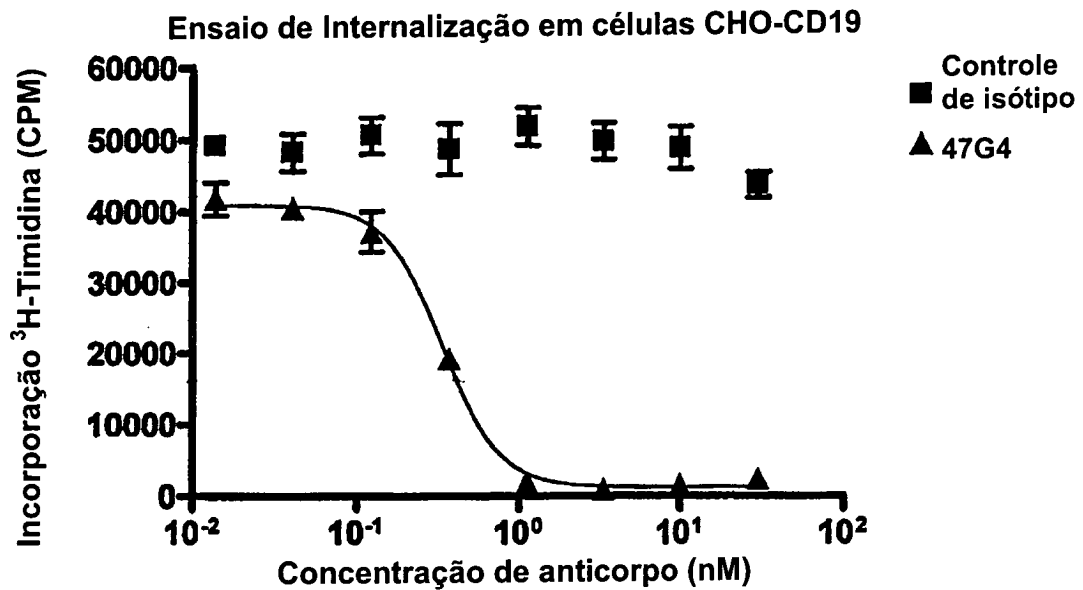


FIG. 26A

Ensaio de Internalização em Linhagem de Célula Tumoral derivada de Célula B de Raji

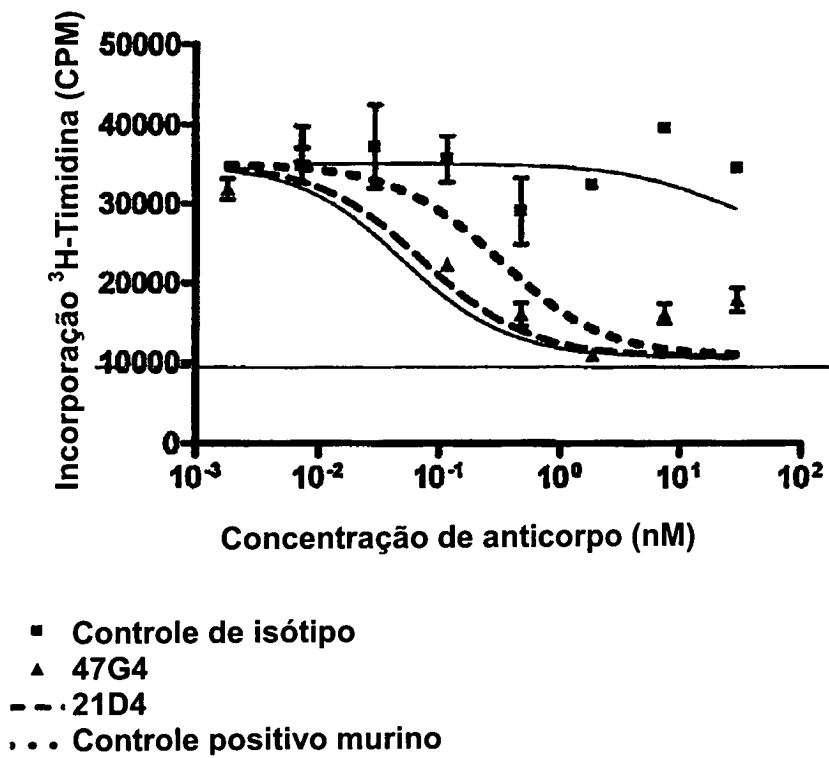
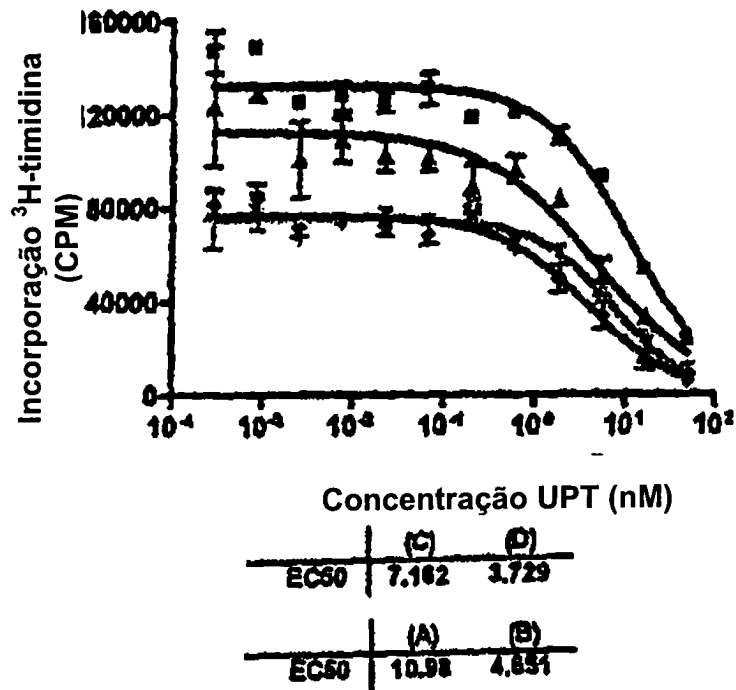
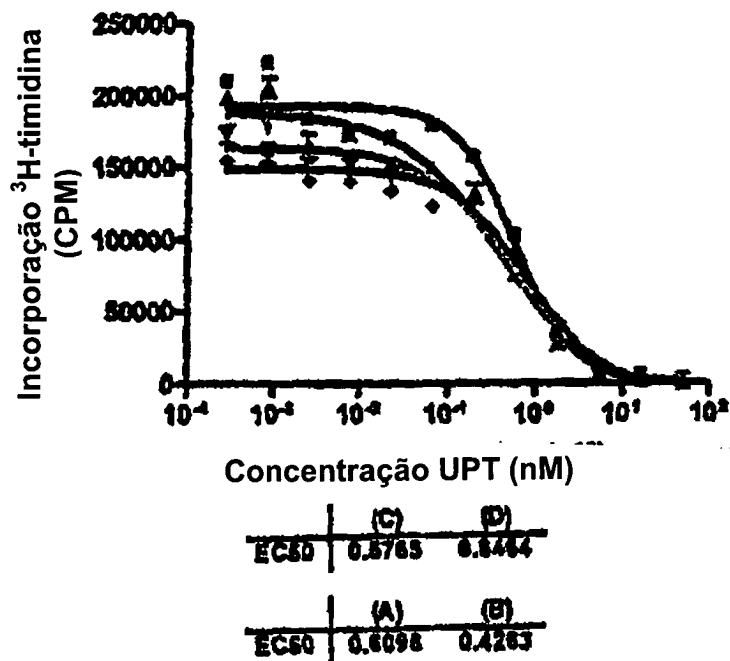


FIG. 26B

Lavagem competição de Ab desnudo(10 x) CD19 de Raji

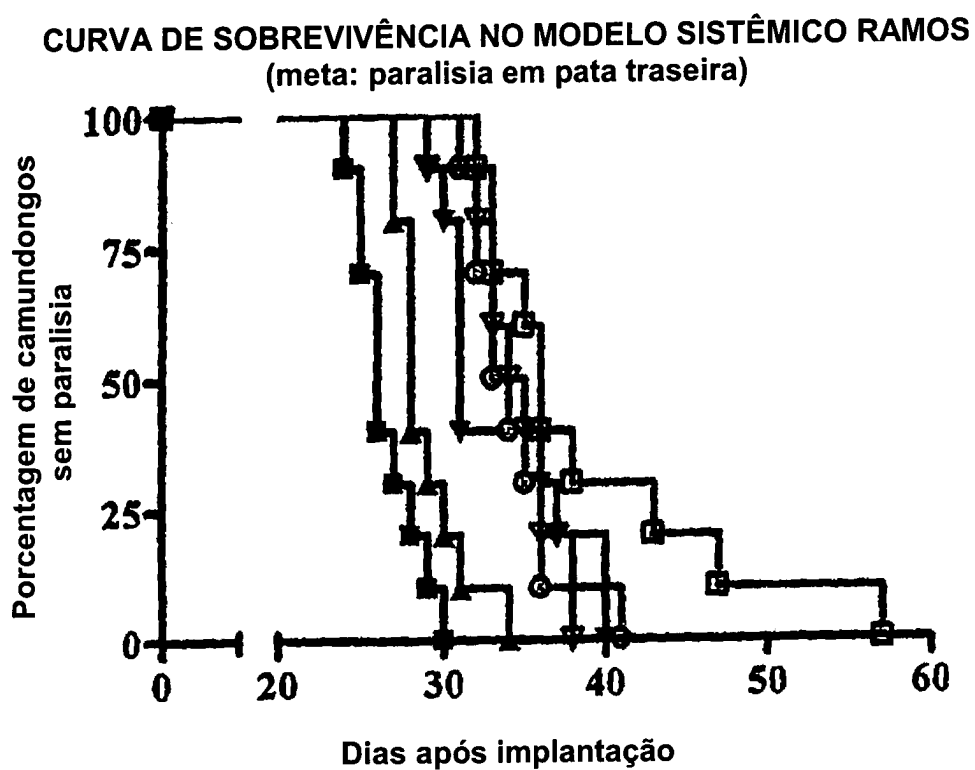


Competição contínua Ab desnudo(10 x) CD19 de Raji



- (A) controle isótipo-tox - isótipo frio
- ▲ (B) 21D4-tox - isótipo frio
- ▼ (C) controle isótipo-tox - 21D4a frio
- ◆ (D) 21D4-tox - 21D4a frio

FIG. 27



- Tampão de formulação (MST 26d)
- ▲ Controle isótipo-tox, dose dia 7 (MST 28d)
- ▼ 21D4-tox IP, dose dia 7 (MST 31d)
- 21D4 + toxina 0,3, dose dia 7 (MST 36d)
- Controle isótipo + tox iv, dose dia 7 (MST 33,5d)
- ▽ 21D4 30 mg/kg, dose dos dias 7, 14, 21 (MST 34,5d)

FIG. 28

38/45

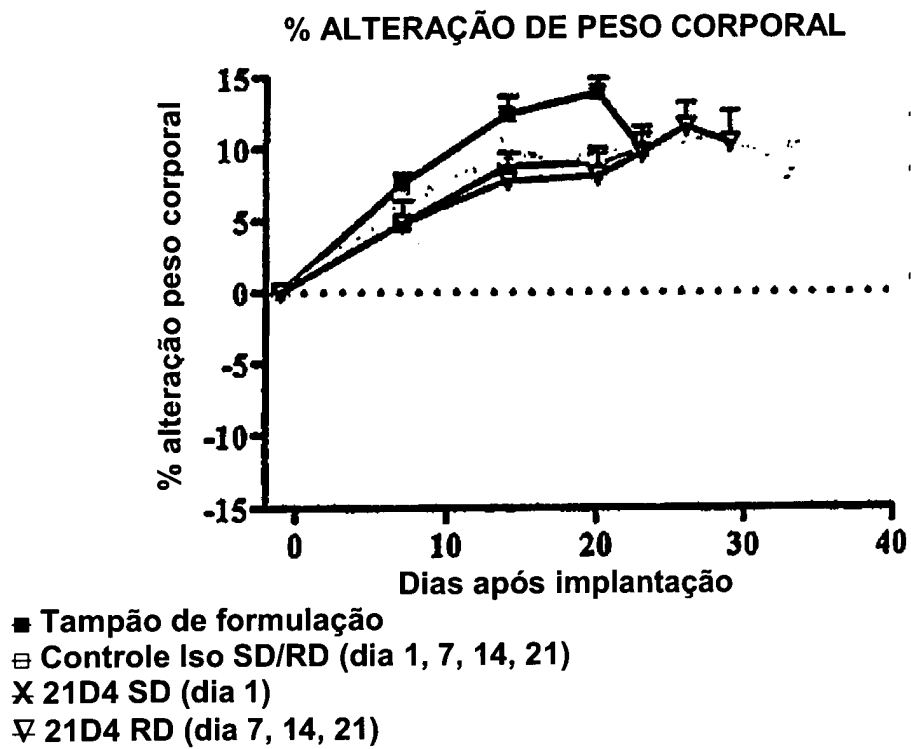
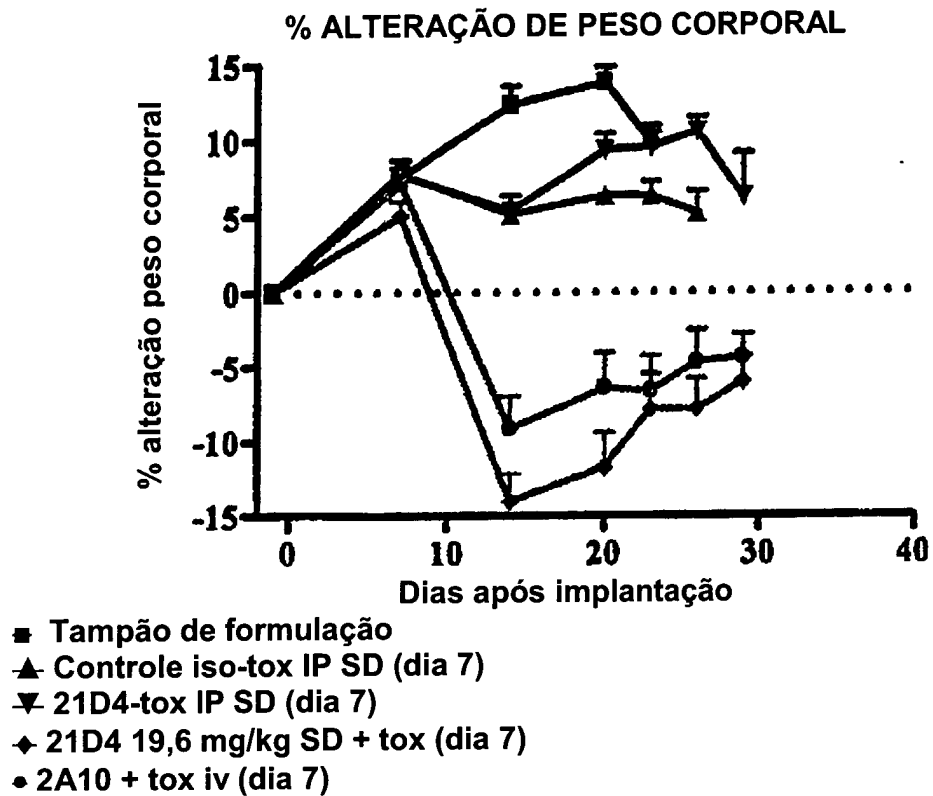


FIG. 29

39/45

EFICÁCIA DE ANTICORPOS DESNUDOS EM DOSE ÚNICA SOBRE
TUMORES ARH-77

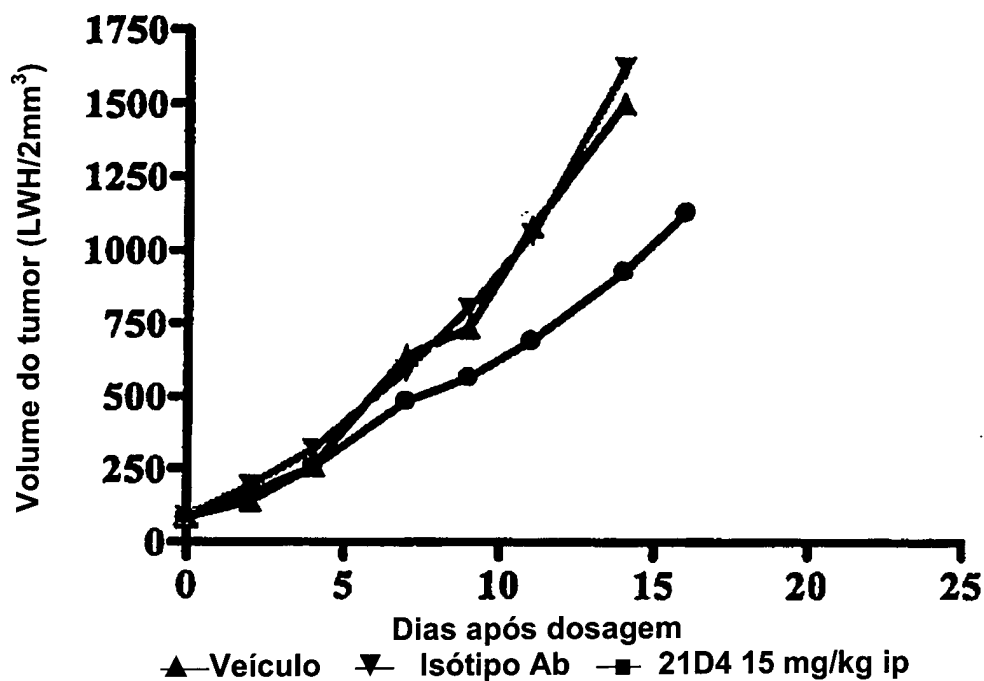


FIG. 30A

EFICÁCIA DE α CD19 Ab DESNUDO EM DOSE ÚNICA SOBRE
TUMORES DE RAJI

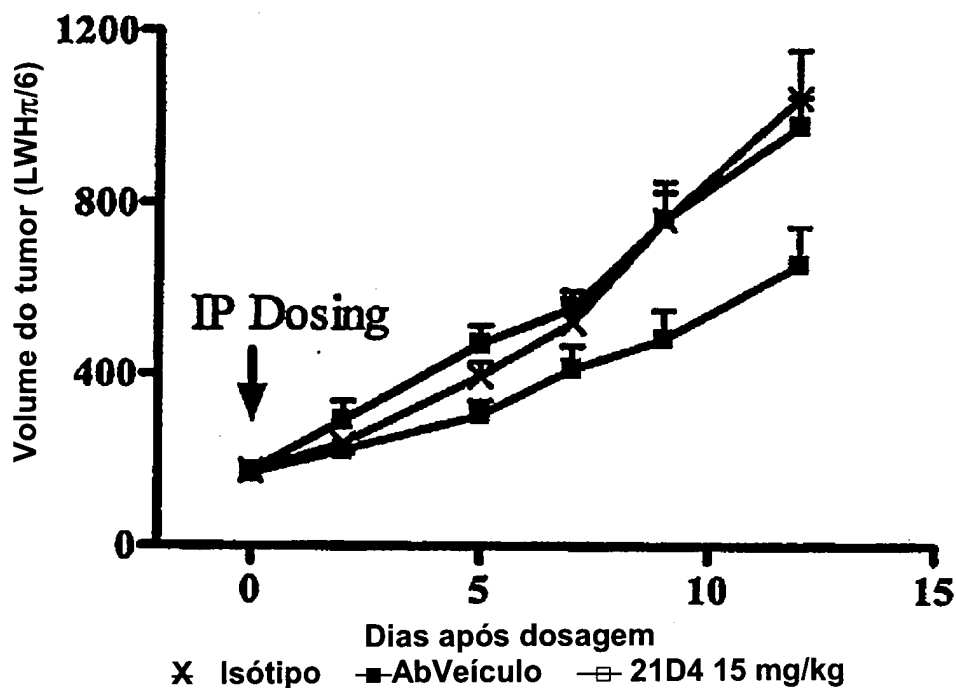
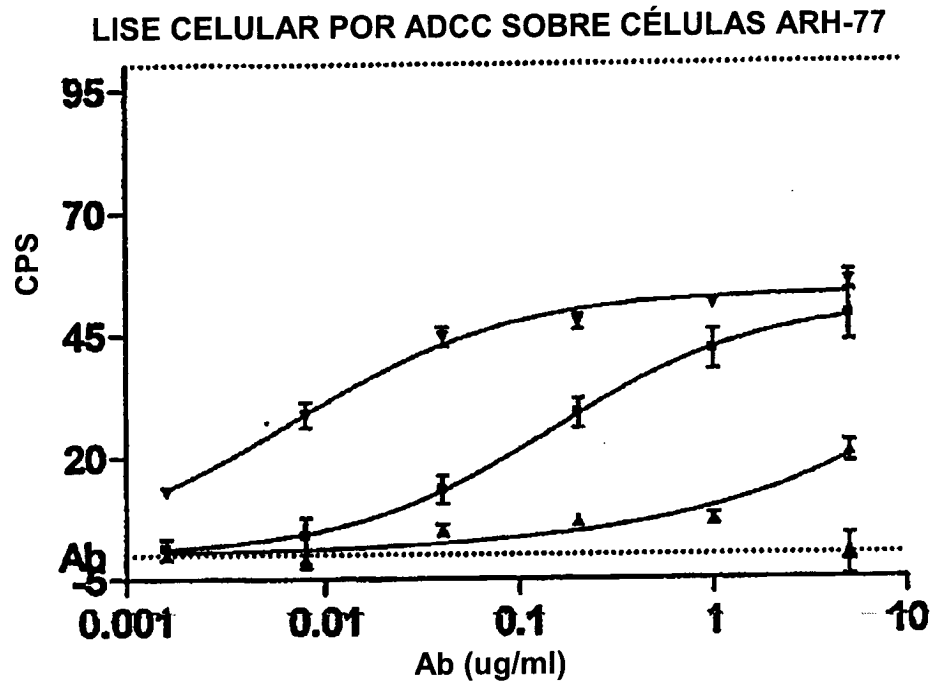


FIG. 30B

40/45



- controle positivo
- ▲ 21D4
- ▼ 21D4 defucose
- ◆ controle isótipo

FIG. 31

41/45

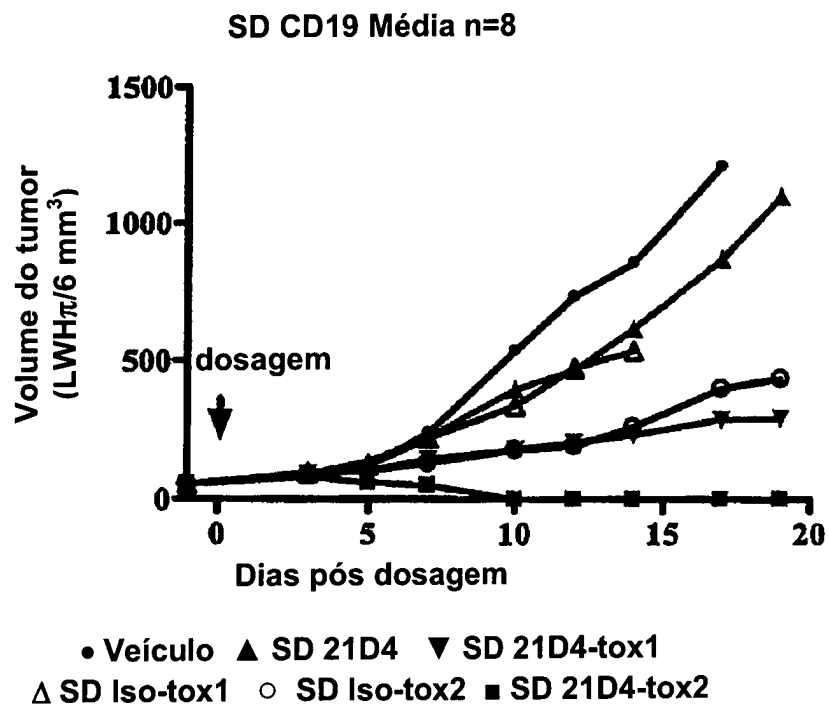
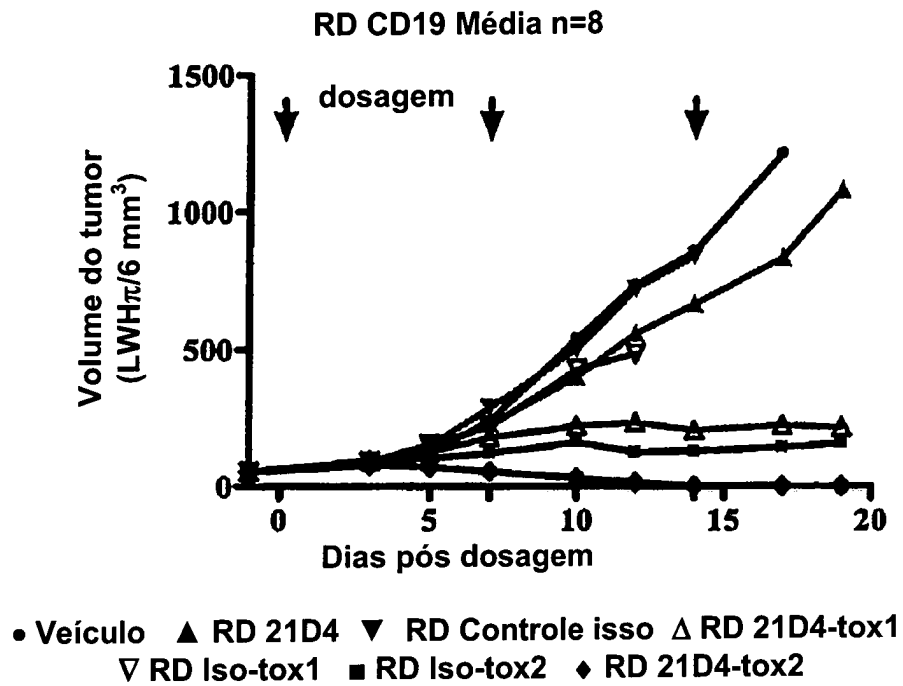
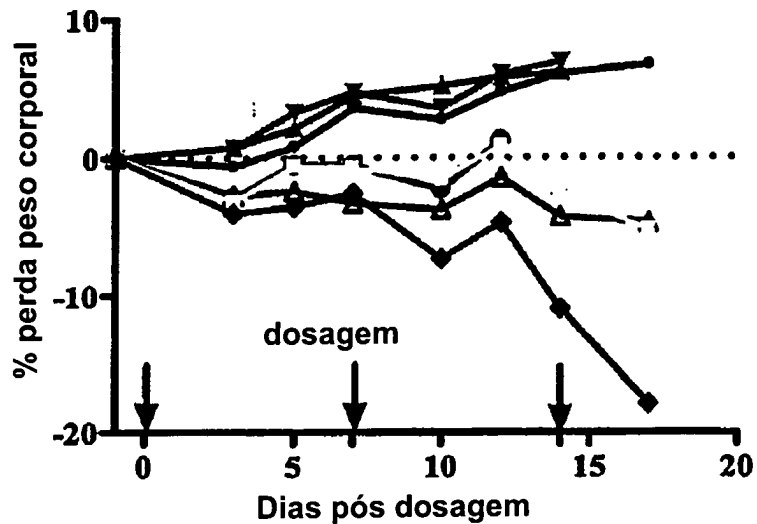


FIG. 32

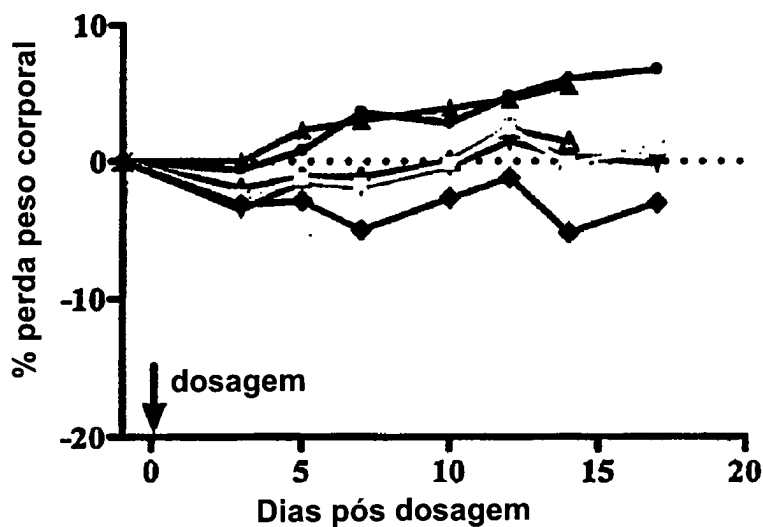
42/45

% MÉDIA PERDA DE PESO CORPORAL RD CD19 n=8



• Veículo ▲ RD 21D4 ▼ RD Iso △ RD 21D4-tox1
 ● RD Iso-tox1 X RD Iso-tox2 ◆ RD 21D4-tox2

% MÉDIA PERDA DE PESO CORPORAL SD CD19 n=8



• Veículo ▲ SD 21D4 ▼ SD 21D4-tox1
 △ SD Iso-tox1 SD Iso-tox2 ◆ SD 21D4-tox2

FIG. 33

43/45

CD20

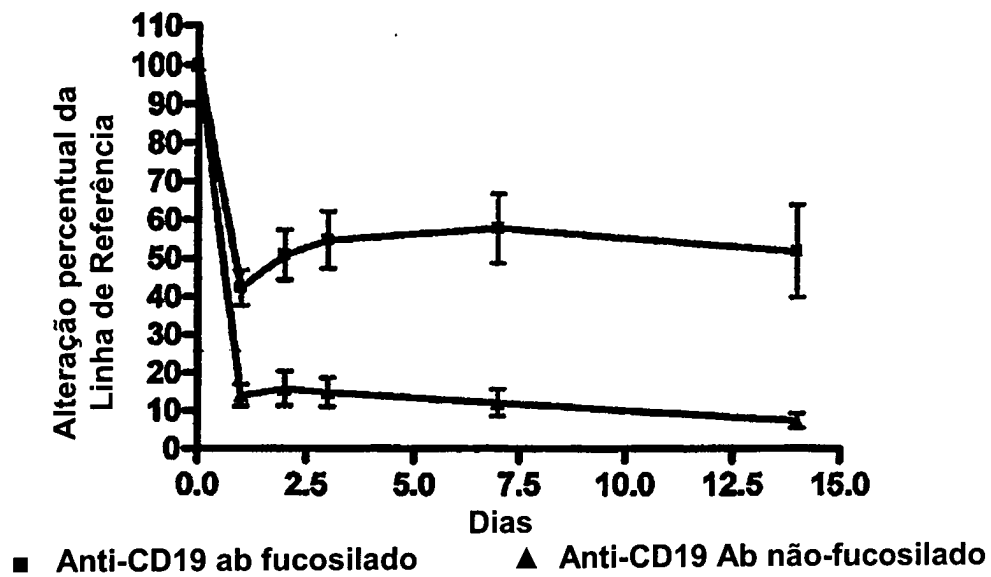


FIG. 34

CD230

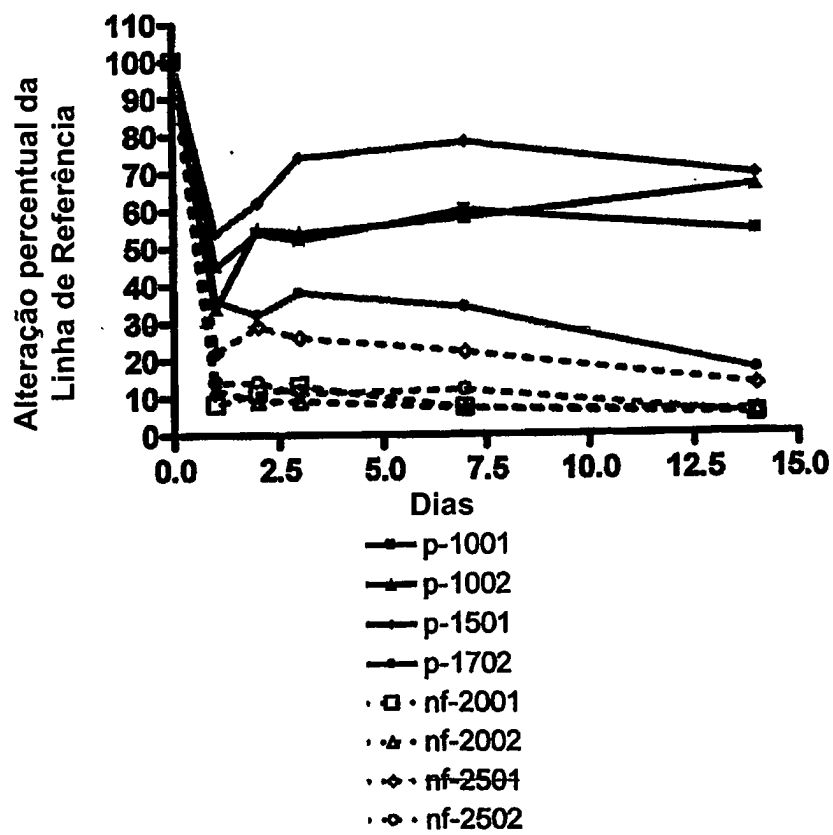
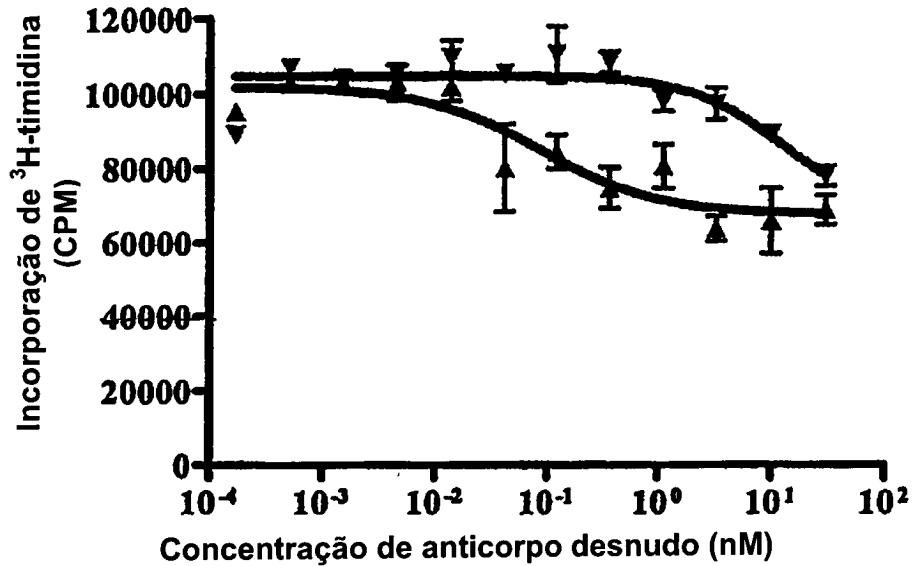


FIG. 35

Ensaio de 72 h de Anticorpos Desnudos sobre Células de RAJI



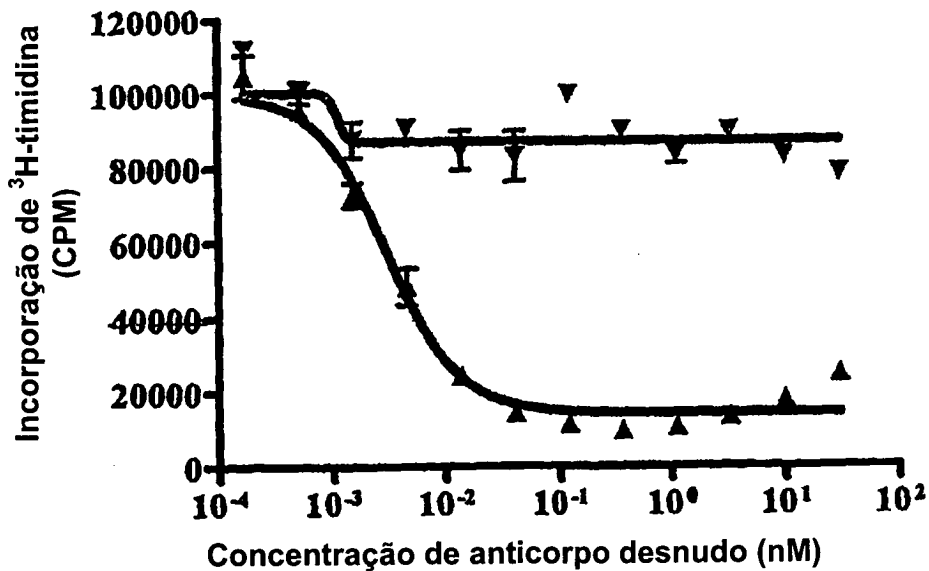
▲ 21D4

▼ Controle isótipo

	21D4
EC50	0.08766

FIG. 36A

Ensaio de 72h de Anticorpos Desnudos sobre Células SU-DHL-6



▲ 21D4

▼ Controle isótipo

	21D4
EC50	0.003058

FIG. 36B

Ensaio Contínuo de 72h de SU-DHL-6

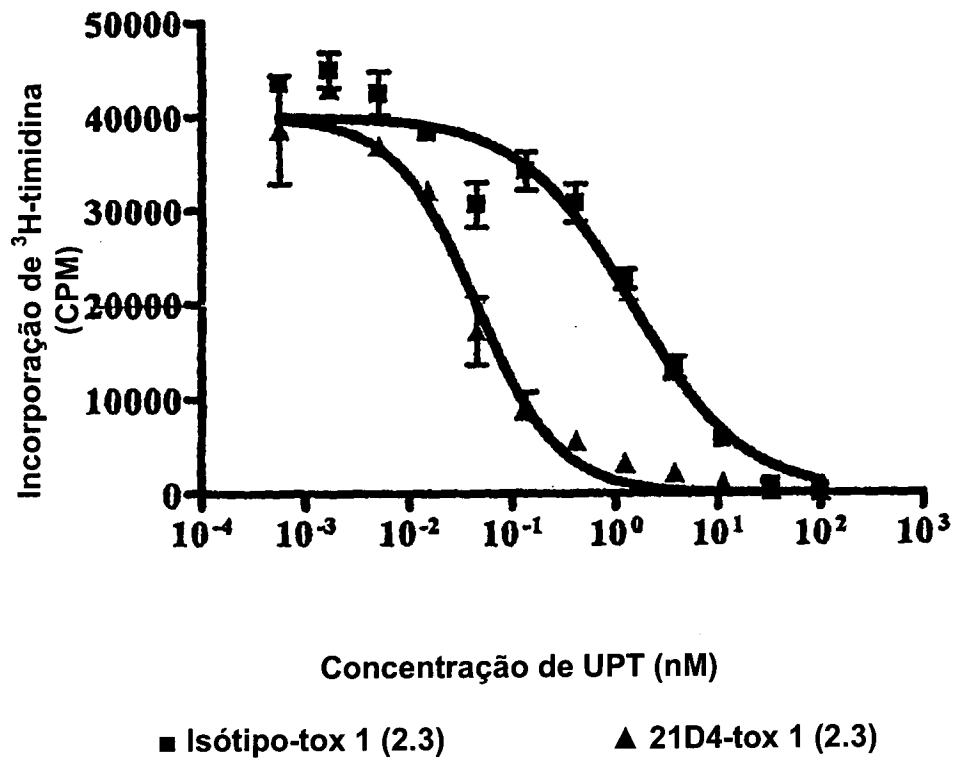


FIG. 36C

RESUMO

“ANTICORPO MONOCLONAL ISOLADO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO ANTI-CD19, 5 MÉTODO PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS EXPRESSANDO CD19 E MÉTODO PARA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B NUM INDIVÍDUO”.

A presente descrição provê anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos 10 que ligam-se especificamente a CD19 com alta afinidade. As moléculas de ácido nucleico que codificam tais anticorpos CD19, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos CD19 são também providos. Imunoconjugados, moléculas 15 biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos CD19 são também providos. Métodos para detectar CD19, bem como métodos para tratar diversas malignidades de célula B, incluindo linfoma não-Hodgkin, são também descritos.