



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

(11) PI 0923228-1 B1



(22) Data do Depósito: 02/12/2009

(45) Data de Concessão: 03/03/2022

(54) Título: PROCESSOS PARA MELHORAR A ATIVIDADE ANTAGONISTA E PARA RASTREAR UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTAGONISTA DIRECIONADO CONTRA UMA MOLÉCULA-ALVO ESPECÍFICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/00; C07K 16/28; C07K 16/46; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2008 IB PCT/IB2008/055664; 05/06/2009 US 61/184,406.

(73) Titular(es): PIERRE FABRE MEDICAMENT.

(72) Inventor(es): LILIANE GOETSCH; THIERRY WURCH.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009066205 de 02/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/063746 de 10/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/06/2011

(57) Resumo: PROCESSO PARA A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE UM ANTICORPO MONOCLONAL. A presente invenção refere-se ao campo da engenharia de anticorpos e, mais especificamente, a um processo para o rastreamento de anticorpos e/ou para modulação da atividade agonista/antagonista de anticorpos. Mais especificamente, a presente invenção diz respeito a um processo para melhorar a atividade antagonista de um anticorpo monoclonal direcionada contra uma molécula-alvo específica ou um fragmento funcional divalente ou derivado do mesmo, o referido anticorpo sendo capaz de inibir uma ou mais das atividades biológicas da referida molécula-alvo, em que o referido processo compreende um estágio de reconfiguração da região de articulação, consistindo em uma modificação da sequência de aminoácidos da referida região articulação pela deleção, pela adição ou pela substituição de pelo menos um aminoácido. A presente invenção refere-se também a polipetídeos úteis para tal método de modulação e aos anticorpos obtidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"PROCESSOS PARA MELHORAR A ATIVIDADE ANTAGONISTA E
PARA RASTREAR UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTAGONISTA
DIRECIONADO CONTRA UMA MOLÉCULA-ALVO ESPECÍFICA".**

[0001] A presente invenção refere-se ao campo da engenharia de anticorpos e, mais especificamente, a um processo para o rastreamento de anticorpos e/ou a modulação da atividade agonista/antagonista de anticorpos. Mais especialmente, a presente invenção diz respeito a um método para a modulação da atividade antagonista de um anticorpo monoclonal ou de um fragmento funcional divalente ou derivado deste por engenharia genética. A invenção refere-se também a polipeptídeos úteis para tal método de modulação e aos anticorpos obtidos.

[0002] Os termos "anticorpo", "anticorpos" ou "imunoglobulina" são utilizados alternadamente no sentido mais amplo possível e incluem anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais completos ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes ou anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos desde que exibam a atividade biológica desejada).

[0003] Mais especialmente, tal molécula consiste em uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é formada por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é formada por uma região variável de cadeia leve (neste relatório descritivo, abreviada em LCVR ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante da cadeia leve é formada por um único domínio, CL. As regiões da VH e da VL podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de arcabouço

(framework, FR). Cada VH e VL é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas, a partir do amino terminal para o carbóxi terminal, na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem atuar na mediação da ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico.

[0004] As cadeias pesadas de imunoglobulinas podem ser divididas em três regiões funcionais: a região Fd, a região de articulação (de articulação), a região Fc (fragmento cristalizável) que estão conectadas por uma região de articulação flexível. A região Fd compreende os domínios VH e CH1 e, combinada com a cadeia leve, forma Fab – o fragmento de ligação a antígenos. O fragmento Fc é responsável pelas funções efectoras da imunoglobulina, as quais incluem, por exemplo, fixação de complemento e ligação a receptores Fc cognatos de células efectoras. A região de articulação, encontrada em imunoglobulinas das classes IgG, IgA e IgD, atua como espaçador flexível que permite que a porção Fab se mova livremente em termos espaciais relativamente à região Fc. Em contraste às regiões constantes, o domínio de articulação é estruturalmente diverso, variando em sequência e em extensão entre classes e subclasses de imunoglobulinas.

[0005] De acordo com estudos de cristalografia, a região de articulação de imunoglobulinas pode ser ainda subdividida estrutural e funcionalmente em três regiões: a região de articulação superior, a central e a de articulação inferior (Shin *et al.*, *Immunological Reviews* 130:87, 1992). A região de articulação superior inclui aminoácidos da extremidade carboxila da CH1 até o primeiro resíduo da articulação

que restringe a movimentação, geralmente o primeiro resíduo cisteína que forma uma ligação dissulfeto intercadeia entre as duas cadeias pesadas. A extensão da região de articulação superior correlaciona-se com a flexibilidade segmentar do anticorpo. A região de articulação central contém pontes dissulfeto entre cadeias pesadas. A região de articulação inferior une a extremidade amino terminal e inclui resíduos do domínio CH2. A região de articulação central da IgG1 humana contém a sequência Cys-Pro-Pro-Cys que, quando dimerizada por formação de ligações dissulfeto, resulta em um octapeptídeo cíclico que supostamente atua como pivô, conferindo dessa forma a flexibilidade. Alterações conformacionais, permitidas pela estrutura e a flexibilidade da sequência polipeptídica da região de articulação da imunoglobulina, pode afetar as funções efetoras da porção Fc do anticorpo.

[0006] Em geral, para preparar anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais, é possível fazer referência a técnicas que estão descritas em especial no manual "*Antibodies*" (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 726, 1988) ou a técnica de preparo a partir de hibridomas, descrita por Kohler e Milstein (Nature, 256:495-497, 1975). Em seguida, os anticorpos monoclonais, podem, por exemplo, ser purificados em coluna de afinidade na qual o receptor de interesse ou um de seus fragmentos contendo o epítipo especificamente reconhecido pelos referidos anticorpos monoclonais que foram previamente imobilizados. Mais especificamente, os referidos anticorpos monoclonais podem ser purificados por cromatografia em proteína A e/ou G, seguido ou não por cromatografia por troca iônica visando eliminar os contaminantes proteicos residuais, bem como o DNA e a LPS, esta seguida ou não por cromatografia por exclusão em gel Sepharose a fim de eliminar os agregados potencialmente

causados pela presença de dímeros ou outros multímeros. Em maneira ainda mais preferida, todas estas técnicas podem ser utilizadas simultânea ou sucessivamente.

[0007] Por fragmento funcional de um anticorpo de acordo com a invenção, entende-se indicar especificamente um fragmento de anticorpo, tal como Fv, scFv (sc significando cadeia única), Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos scFv-Fc ou diabodies ou qualquer fragmento cujo tempo de meia-vida tivesse sido aumentado por modificação química, como a adição de poli(alquilen) glicol, por exemplo, poli(etileno)glicol ("PEGuilação") (fragmentos pequilados denominados Fv-PEG, scFV-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG ou Fab'-PEG) ("PEG" significando Poli(Etileno)Glicol), ou por incorporação em lipossomo, os referidos fragmentos contendo pelo menos uma das CDRs características do anticorpo original.

[0008] De preferência, estes fragmentos funcionais serão fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', do tipo scFv-Fc ou diabodies, os quais exibem geralmente a mesma especificidade de ligação que o anticorpo do qual descendem. De acordo com a presente invenção, fragmentos de anticorpos da invenção podem ser obtidos a partir de anticorpos, tais como descritos acima, por métodos como digestão por enzimas, tais como tripsina ou papaína, e/ou por clivagem das pontes dissulfeto por redução química. Em outra maneira, os fragmentos de anticorpos, incluídos na presente invenção, podem ser obtidos por técnicas de recombinação genética igualmente bem conhecidos daqueles versados no estado da técnica, ou então por síntese de peptídeos por meio de, por exemplo, sintetizadores automáticos de peptídeos como aqueles fornecidos pela empresa Applera, etc.

[0009] O termo "antagonista", neste relatório descritivo, refere-se a uma molécula que é capaz de inibir uma ou mais das atividades biológicas de uma molécula-alvo, tal como um receptor extracelular ou

transmembrana. Antagonistas podem atuar interferindo com a ligação de um receptor a um ligante e vice-versa, diminuindo a fosforilação de receptores e/ou incapacitando ou eliminando células que foram ativadas por um ligante. O antagonista pode bloquear completamente interações entre receptor e ligante ou podem reduzir substancialmente estas interações por competição, alteração de conformação, blindagem ou regulação negativa. Todos esses pontos de intervenção, por um antagonista, serão considerados equivalentes para fins desta invenção.

[00010] O termo "agonista", neste relatório descritivo, refere-se a qualquer composto, incluindo proteína, polipeptídeo, peptídeo, anticorpo, fragmento de anticorpo, conjugado, grande molécula, pequena molécula, capaz de ativar uma ou mais das atividades de uma molécula-alvo.

[00011] Na pesquisa de anticorpos terapêuticos, é frequentemente esperado obter anticorpos como antagonistas tanto quanto possível.

[00012] Exemplos clássicos de anticorpos antagonistas são Herceptina, Pertuzumabe, Cetuximabe, anticorpos anti-VEGFR ou anti-IGF-1R.

[00013] A título de exemplo específico, pode ser citado o anticorpo anti-c-Met 5D5, gerado pela Genentech [WO 96/38557], que se comporta como potente agonista quando adicionado isoladamente em vários modelos. A fim de solucionar essa questão técnica, este anticorpo teve que ser engenheirado como fragmento Fab ou em forma de anticorpo monovalente (com um braço 5D5) para que exibisse atividade antagonista. Em consequência, este anticorpo não pode ser considerado anticorpo, porém um fragmento, e não apresenta todas as vantagens oferecidas pelo formato de "anticorpo completo" (sem funções efectoras, menor clearance (depuração) e meia-vida mais curta [2 vezes mais rápido do que anticorpos

bivalentes tradicionais, como descrito em Pôster 411 no 20º simpósio EORTC-NCI-AACR, Genebra, 21-24 de outubro, 2008]).

[00014] O técnico versado no assunto reconhecerá que funções efetoras incluem, por exemplo, ligação a Clq; citotoxicidade dependente de complemento (ADCC); fagocitose e regulação negativa de receptores de superfície de células (por exemplo, receptor de células B; BCR) e prolongamento de meia-vida pela incorporação do ligante de salvamento de ligação a receptor (FcRn), como descrito em, por exemplo, Patente U.S. Nº 5 739 277, concedida em 14 de abril de 1998.

[00015] Um dos aspectos inventivos da presente invenção é solucionar estas questões técnicas, ou seja, melhorar a atividade antagonista de um anticorpo, ao mesmo tempo em que preservando um formato "divalente completo".

[00016] Cabe mencionar neste relatório descritivo que a invenção pode ser aplicada para modular a atividade agonista/antagonista de anticorpos humanos, obtidos por imunização de "camundongos humanos" (camundongos geneticamente modificados que produzem imunoglobulinas humanas) ou usando técnicas de exibição em fagos para construir anticorpos completos a partir de fragmentos scFV, Fab ou quaisquer outros selecionados.

[00017] Outra dificuldade técnica clássica pode ser encontrada durante a quimerização e/ou humanização de um anticorpo murino. É fato bem conhecido pelo técnico versado no assunto que, apesar de o processo de quimerização e/ou humanização de um anticorpo murino ser bem fácil em teoria, não é fácil controlar a quimerização e/ou humanização deste anticorpo murino sem a Perda total ou parcial das propriedades iniciais. O anticorpo quimérico ou humanizado pode perder parte de suas atividades de ADCC, CDC, antagonista/agonista, de ligação, (TBC), etc. A presente invenção diz respeito, mais

especialmente, à modificação de atividade agonista/antagonista de um anticorpo murino após um processo de quimerização e/ou humanização.

[00018] A título de exemplo específico, um conjunto de anticorpos anti-cMet, a seguir descritos como 224G11, 2274H1 e 11E1, que se comportam como potentes anticorpos antagonistas murinos, tornaram-se agonistas parciais quando quimerizados em formato de IgG1 humana. Esse deslocamento de potentes antagonistas para agonistas parciais resultou em perda completa de atividade in vivo em modelos de xenoenxertos.

[00019] A presente invenção pretende solucionar estas dificuldades e refere-se, mais especificamente, a um processo para melhorar a atividade antagonista de um anticorpo monoclonal direcionado contra uma molécula-alvo específica, ou fragmento funcional divalente ou derivado deste, o referido anticorpo sendo capaz de inibir uma ou mais das atividades biológicas da referida molécula-alvo, em que o referido processo compreende um estágio de reconfiguração da região de articulação, consistindo em uma modificação da sequência de aminoácidos da referida região de articulação pela deleção, a adição ou a substituição de pelo menos um aminoácido.

[00020] É evidente que a expressão "melhorar a atividade antagonista" deve ser interpretada em seu sentido mais amplo possível, ou seja, em termos de o resultado desejado. No contexto de mecanismo, este resultado pode ser obtido por melhora da atividade antagonista intrínseca e/ou redução da atividade agonista intrínseca de um anticorpo.

[00021] Mais especificamente, definições básicas de termos em farmacologia quantitativa têm como base as recomendações atualizadas fornecidas pelo Comitê da International Union of Pharmacology (IUPHAR) sobre Nomenclatura de receptor (consultar

Neubig et al, 2003).

[00022] O termo "agonista" representa um ligante (qualquer tipo de molécula) que se liga a um receptor e altera o estado do receptor, resultando em resposta biológica estimuladora ou aumentada. Agonistas podem atuar como agonistas completos ou agonistas parciais:

[00023] - Agonista completo: quando o estímulo do receptor, induzido por um agonista, atinge a capacidade máxima de resposta do sistema, em seguida, este produzirá a resposta máxima do sistema e será um agonista completo naquele sistema. Diversos agonistas podem provocar a mesma resposta máxima, todos são agonistas completos naquele sistema experimental.

[00024] - Agonista parcial: uma molécula que em determinado tecido, sob condições especificadas, não é capaz de provocar um efeito tão grande (mesmo quando aplicado em alta concentração, de modo que todos os receptores estejam ocupados) como um agonista completo atuando através dos mesmos receptores no mesmo sistema. Agonistas parciais são em geral também antagonistas parciais uma vez que, na presença de um agonista completo, reduzem a resposta máxima do referido agonista completo para a sua própria resposta máxima. Essa designação de agonista completo em comparação a parcial é dependente do sistema, e um agonista completo para um sistema ou mensuração pode ser agonista parcial em outro.

[00025] O termo "antagonista" representa uma molécula que reduz a ação de outro fármaco, em geral agonista. Muitos antagonistas atuam, na mesma macromolécula do receptor, como o agonista.

[00026] - A eficácia do antagonismo pode ser de antagonismo completo, quando a resposta do sistema na copresença do antagonista e do agonista corresponde à atividade basal (sem qualquer ligante) do sistema.

[00027] - Um antagonista pode atuar como antagonista parcial quando a inibição máxima (mesmo quando aplicado em alta concentração, de modo que todos os receptores estejam ocupados pelo antagonista) provocada pela copresença do antagonista e do agonista é acima da atividade basal do sistema.

[00028] - O antagonismo pode ser competitivo quando a ligação do agonista e do antagonista se excluem mutuamente. Isso pode ser porque o agonista e o antagonista competem pelo mesmo sítio de ligação ou se combinam com sítios adjacentes que se sobrepõem. Uma terceira possibilidade é a de que diferentes sítios estão envolvidos, porém estes influenciam a macromolécula do receptor em tal maneira que as moléculas agonistas e antagonistas não são capazes de se ligar ao mesmo tempo.

[00029] - Antagonismo não competitivo é observado quando o agonista e o antagonista podem se ligar simultaneamente ao receptor; a ligação do antagonista reduz ou impede a ação do agonista sem ou com qualquer efeito sobre a ligação do agonista.

[00030] A deleção, adição ou substituição pode ser realizada classicamente por qualquer método conhecido por aqueles versados no estado da técnica.

[00031] Vários métodos podem ser aplicados pelo técnico no assunto para gerar adições, deleções ou inserções de DNA com DNase pancreática, digestão parcial de DNA com enzimas de restrição, mutantes de inserções à base de ligantes, conjuntos aninhados de mutantes de deleção usando BLA31 nuclease, DNase I ou exonuclease III. Estes métodos estão extensamente descritos em manuais de laboratório tais como Molecular Cloning, A laboratory manual (Sambrook, Fritsch e Maniatis). Diversos métodos à base de PCR podem também ser empregados para gerar deleções, inserções ou mutagênese sítio-dirigida em molécula de DNA, PCR por extensão

sobreposta (Wurch et al, 1998), porém não se limitam a este. Para mutagênese sítio-dirigida, várias outras técnicas podem ser utilizadas, podendo-se mencionar, a título de exemplos, mas sem se limitar a estes, mutagênese à base de oligonucleotídeos de acordo com métodos de iniciador único ou duplos, o método de Kunkel à base de incorporação de uracil (Kunkel, 1985). Estes métodos estão extensamente descritos em manuais de laboratório tais como Molecular Cloning, A laboratory manual (Sambrook, Fritsch e Maniatis).

[00032] A título de exemplo não limitativo de adição, pode-se citar a adição de uma Prolina em ou adjacente à região de articulação.

[00033] Em uma concretização preferida do processo da invenção, a referida modificação é selecionada a partir de:

- i) a deleção de pelo menos um aminoácido da sequência de aminoácidos da referida região de articulação; e/ou
- ii) a adição de pelo menos uma ponte dissulfeto na referida região de articulação.

[00034] No intuito de esclarecer a invenção, a primeira modalidade (i) será detalhada primeiramente e a segunda modalidade (ii) será detalhada depois. Deve ser entendido que essa ordem decorre somente da redação do presente pedido de patente e que ambas estas modalidades, como se tornará evidente a seguir, são de importância semelhante.

[00035] Em uma concretização específica, uma maneira para se modificar a sequência de aminoácidos da região de articulação consistirá na deleção de no máximo 2, 3, ou 4 aminoácidos da sequência de aminoácidos da referida região de articulação.

Uma modalidade específica da invenção é a de que o referido anticorpo monoclonal é divalente. Na verdade, como visto abaixo, é possível modular a atividade agonista/antagonista de um

anticorpo modificando a estrutura do referido anticorpo. Pela primeira vez, os inventores relatam uma maneira original para modular tal atividade agonista/antagonista enquanto preservando uma forma divalente do anticorpo, visando conservar boas propriedades como meia-vida longa ou funções efectoras.

[00036] Pode ser mencionado também que, apesar de a modificação da região de articulação de um anticorpo monoclonal com a finalidade de aumentar as funções efectoras já tenha sido relatada no estado da técnica anterior, nunca foi relatado, ao contrário, que tal modificação na região de articulação seria de interesse na modulação da atividade agonista/antagonista de um anticorpo monoclonal. Este é claramente o objeto da presente invenção, o qual é inovador e inventivo no que diz respeito ao estado da técnica existente.

[00037] Como um aspecto de acordo com o processo da invenção, o anticorpo monoclonal é um anticorpo quimérico.

[00038] Por anticorpo "quimérico", entende-se indicar um anticorpo que contém uma região variável natural (cadeia leve e cadeia pesada), derivada de um anticorpo de uma determinada espécie, combinada com as regiões constantes da cadeia leve e pesada de um anticorpo de uma espécie heteróloga à referida determinada espécie (por exemplo, camundongo, cavalo, coelho, cachorro, vaca, galinha, etc.).

[00039] Os anticorpos ou seus fragmentos de tipo quimérico de acordo com a invenção podem ser preparados usando as técnicas de recombinação genética. Por exemplo, o anticorpo quimérico pode ser produzido clonando um DNA recombinante, contendo um promotor e uma sequência codificadora para a região variável de um anticorpo monoclonal não humano, especialmente murino, de acordo com a invenção, e uma sequência codificadora para a região constante de anticorpo humano. Um anticorpo quimérico da invenção, codificado por tal gene recombinante, será, por exemplo, uma quimera camundongo-

homem, a especificidade deste anticorpo sendo determinada pela região variável derivada do DNA murino e seu isotipo determinado pela região constante derivada do DNA humano. Para os métodos de preparo de anticorpos quiméricos, é possível, por exemplo, fazer referência aos artigos de Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) ou a Patente U.S. Nº 4 816 567.

[00040] Como outro aspecto de acordo com o processo da invenção, o anticorpo monoclonal é do tipo humanizado.

[00041] Por "anticorpo humanizado", entende-se indicar um anticorpo que contém regiões CDRs derivadas de um anticorpo de origem não humana, as outras partes da molécula do anticorpo sendo derivadas de um (ou de vários) anticorpo humano ou de sequências de linhagem germinativa. Adicionalmente, alguns resíduos dos segmentos do esqueleto (denominado FR) podem ser modificados de modo a ser conservada a afinidade da ligação (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyn et al, Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

[00042] Os anticorpos humanizados de acordo com a invenção ou seus fragmentos podem ser preparados por técnicas conhecidas por aqueles versados no estado da técnica (tais como, por exemplo, aquelas descritas nos artigos de Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 ou Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992).

[00043] Outros métodos de humanização são conhecidos pelo técnico versado no assunto como, por exemplo, o método de "Enxerto de CDR", descrito pela Protein Design Lab (PDL) nos pedidos de patente EP 0 421 216, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 ou US 5 530 101, US 6 180 370, US 5 585 089 e US 5 693 761. Os seguintes pedidos de patente podem ser também citados: US 5 639 641, US 6

054 297, US 5 886 152 e US 5 877 293.

[00044] Como outro aspecto de acordo com o processo da invenção, o anticorpo monoclonal é anticorpo humano.

[00045] O termo "anticorpo humano" inclui todos os anticorpos que possuem uma ou mais regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulinas humanas. Em uma concretização preferida, todos os domínios (ou regiões) variáveis e constantes são derivados de sequência de imunoglobulina humana (anticorpo completamente humano). Em outras palavras, inclui qualquer anticorpo que possua regiões variáveis e constantes (se presente) derivadas de sequências da linhagem germinativa de imunoglobulina humana, ou seja, que possuem uma sequência de aminoácidos que corresponda àquela de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou que tenha sido feito usando quaisquer técnicas para produção de anticorpos humanos, conhecidas pelo técnico versado no assunto.

[00046] Em uma concretização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, camundongo transgênico, com genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve fundidos a uma célula imortalizada.

[00047] A título de exemplo deste camundongo transgênico, pode ser mencionado o XENOMOUSE™, o qual é uma linhagem engenheirada de camundongo que compreende fragmentos grandes dos loci de imunoglobulina humana e é deficiente em produção de anticorpos de camundongo (Green et al., 1994, Nature Genetics, 7:13-21). O XENOMOUSE™ produz um repertório humano tipo adulto de anticorpos completamente humanos, e gera anticorpos monoclonais humanos específicos para antígenos. Uma segunda geração de XENOMOUSE™ contém aproximadamente 80% di repertório humano

de anticorpos (Green & Jakobovits, 1998, J. Exp. Med., 188:483-495).

[00048] Qualquer outra conhecida pelo técnico versado no assunto, tal como técnica de exibição em fagos, pode também ser utilizada para a geração de anticorpo humano de acordo com a invenção.

[00049] O processo de acordo com a invenção pode ser utilizado para qualquer tipo de imunoglobulina compreendendo uma região de articulação, ou seja, IgA, IgD e IgG.

[00050] A título de exemplo, para o isotipo IgA, a região de articulação de IgA1 compreende a sequência de aminoácidos PSTPPTPSPSTPPTSPSPS (SEQ ID No. 8) e a região de articulação de IgA2 compreende a sequência de aminoácidos PPPP (SEQ ID No. 9).

[00051] De maneira semelhante, a região de articulação de IgD compreende a sequência de aminoácidos SPKAQASSVPTAQPPQAEGSLAKATTAPATTRNTRGGEEKKKEKEKE EQEERETKTP (SEQ ID No. 10).

[00052] Como uma modalidade particular da invenção, é preferido utilizar IgG, incluindo, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

[00053] As respectivas sequências de aminoácidos correspondentes aos diferentes isotipos de regiões de articulação de IgG são:

PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID No. 11) para IgG1,

RKCCVECPPCP (SEQ ID No. 7) para IgG2,

LKTPPLFTGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCD

TPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (SEQ ID No. 12) para IgG3, e

SKYGPPCPSCP (SEQ ID No. 13) para IgG4.

[00054] Ainda mais especialmente, é preferido utilizado IgG1. Na verdade, no campo de anticorpos terapêuticos e, mais especialmente, no tratamento de câncer, é preferido gerar IgG1 para obter funções efetoras como ADCC e CDC, além de funções vinculadas à ligação específica ao alvo antigênico.

[00055] O processo da invenção é caracterizado em que o referido anticorpo monoclonal é IgG1.

[00056] "Molécula-alvo", dentro do significado da invenção, refere-se a qualquer molécula que o anticorpo monoclonal seja capaz de ligar-se especificamente ou de modular a atividade. Em geral, esta molécula-alvo pode ser denominada "antígeno".

[00057] A título de exemplo não restritivo de molécula-alvo contra a qual um anticorpo monoclonal pode ser direcionado, podem ser citados ligantes solúveis, receptores tais como receptores de transmembrana, marcadores tumorais de membrana, etc.

[00058] Em uma concretização preferida, a referida molécula-alvo é um receptor transmembrana.

[00059] A expressão "receptor transmembrana" refere-se a uma proteína que transpõe a membrana plasmática de uma célula, com o domínio extracelular da proteína detendo a capacidade de ligar-se a um ligante e o domínio intracelular exibindo uma atividade (tal como proteína quinase) que pode ser alterada (quer aumentada ou reduzida) quando da ligação ao ligante. Em outras palavras, receptores transmembranas são proteínas que integram a membrana, que residem e operam tipicamente na membrana de uma célula, porém também nas membranas de alguns compartimentos e organelas subcelulares. Ao se ligarem a uma molécula de sinalização ou, às vezes, a um par destas moléculas em um lado da membrana, os receptores transmembranas iniciam uma resposta no outro lado. Nessa maneira, estes receptores desempenham um papel único e importante em comunicação celular e transdução de sinal.

[00060] Muitos receptores transmembranas são compostos por duas ou mais subunidades proteicas que operam coletivamente e que podem dissociar-se, quando ligantes se ligam, destacando-se, ou em outro estágio de seus ciclos de "ativação". São classificados

frequentemente de acordo com sua estrutura molecular, ou pelo fato de a estrutura ser desconhecida em qualquer detalhe para todos, exceto por alguns receptores, com base em sua topologia hipotética (e às vezes experimentalmente verificada) na membrana. Prevê-se que as cadeias polipeptídicas dos mais simples cruzem a barreira lipídica apenas uma vez, enquanto outros a cruzam até sete vezes (os assim chamados receptores acoplados à proteína G ou GPCRs) ou mais.

[00061] Semelhantemente a qualquer proteína que integre a membrana, um receptor transmembrana pode ser subdividido em três partes ou domínios, domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio intracelular.

[00062] O domínio extracelular é a parte do receptor para fora da membrana no lado externo da célula ou organela. Se a cadeia polipeptídica do receptor cruzar a bicamada várias vezes, o domínio externo pode compreender várias "alças" para fora da membrana. Por definição, uma das principais funções de um receptor é reconhecer e responder a um ligante específico, por exemplo, um neurotransmissor ou hormônio (embora certos receptores respondam também a alterações em potencial transmembrana) e, em muitos receptores, estes ligantes se ligam ao domínio extracelular.

[00063] Na maioria dos receptores para os quais existem evidências estruturais, hélices alfa transmembrana constituem a maior parte do domínio transmembrana. Em certos receptores como, por exemplo, o receptor nicotínico de acetilcolina, o domínio transmembrana forma um poro revestido por proteína através da membrana, ou canal iônico. Quando da ativação de um domínio extracelular pela ligação do ligante apropriado, o poro torna-se acessível a íons, os quais então o atravessam. Em outros receptores, os domínios transmembranas supostamente sofrem uma alteração conformacional quando da ligação, cujo efeito é intracelular. Em

alguns receptores, tais como membros da superfamília 7TM, o domínio transmembrana pode conter o bolso de ligação ao ligante.

[00064] O domínio intracelular (ou citoplasmático) do receptor interage com o interior da célula ou organela, transmitindo o sinal. Existem duas fundamentalmente diferentes maneiras para essa interação: a) O domínio intracelular comunica-se via interações específicas proteína-proteína com proteínas efetoras, as quais por sua vez enviam o sinal ao longo da cadeia de sinalização para o seu destino e b) com receptores ligados a enzimas, o domínio intracelular possui atividade enzimática. Frequentemente, esta atividade é do tipo tirosina quinase. A atividade enzimática pode estar situada também em uma enzima associada com o domínio intracelular.

[00065] Existem muitas maneiras para a célula regular a atividade de um receptor transmembrana. Muitas destas operam através do domínio intracelular. As maneiras mais importantes são fosforilação e internalização (consultar ubiquitina) ou ativação de cascatas de segundo mensageiro, tais como cAMP, IP, Ca²⁺ ou cGMP.

[00066] Todas as proteínas de membrana exibindo atividades enzimáticas podem ser também alvos para anticorpos com a modificação descrita nesta invenção. Podem ser citadas, a título de exemplo, entre outros, a família das metaloproteases da matriz (MMP), a família de "proteases com domínio desintegrina e domínio metaloprotease" (ADAM), adenilato ciclases, etc.

[00067] Todas as proteínas de membrana atuando como canais iônicos, poros e transportadoras também ser alvo para anticorpos com a modificação descrita nesta invenção. Podem ser citadas, a título de exemplo, entre outros, a família do canal de sódio, a família do canal de potássio, a família de receptores nicotínicos de acetilcolina, os receptores sigma, a família de transportadoras de monoamina.

[00068] Em sentido mais amplo, todas as proteínas de membrana

identificadas como marcadores específicos para uma determinada doença podem também ser alvo para tratamento com anticorpo, podendo também este anticorpo ser melhorado pelas modificações descritas nesta invenção.

[00069] Em uma concretização preferida da invenção, o referido receptor transmembrana é selecionado do grupo constituído do receptor de tirosina quinase, tetraspanina e GPCRs.

[00070] Em uma concretização preferida da invenção, o referido receptor transmembrana é um receptor tirosina quinase, selecionado de preferência no grupo constituído por IGF-1R, c-Met, RON, Ax1, VEGF, VEGFR, Her-2neu, homodímeros e heterodímeros da família ErbB, etc.

[00071] No presente pedido de patente e, mais especificamente, no relatório descritivo a seguir, as sequências serão definidas em referência a IMGT. A numeração única IMGT foi definida para comparar os domínios variáveis independentemente do receptor antigénico, o tipo de cadeia ou a espécie (Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-57 (2003)). Na numeração única IMGT, os aminoácidos conservados estão sempre na mesma posição, por exemplo, cisteína 23 (1ª CYS), triptofano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido hidrofóbico 89, cisteína 104 (2ª CYS), fenilalanina ou triptofano 118 (J-PHE ou J-TRP). A numeração única IMGT permite delimitar de modo padronizado as regiões framework (FR1-IMGT: posições 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 e FR4-IMGT: 118 a 128) e as regiões determinantes de complementaridade: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 e CRD3-IMGT: 105 a 117. As lacunas (gaps) representam posições não ocupadas, portanto, as

extensões de CDR-IMGT (mostradas entre colchetes e separadas por pontos, por exemplo, [8.8.13]) tornam-se informações fundamentais. A numeração única IMGT é utilizada em representações gráficas bidimensionais, designadas IMGT Colliers de Perles (Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)), e em estruturas tridimensionais em IMGT/3Dstructure-DB (Kass, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)).

[00072] Para aquele versado no estado da técnica, será óbvio transpor a invenção descrita de acordo com o sistema IMGT em qualquer outro sistema de numeração tal como, por exemplo, o sistema de numeração de Kabat.

[00073] A numeração única IMGT, para todas as REGIÕES V de IG e TR de todas as espécies baseia-se na alta conservação da estrutura da região variável. Esta numeração, definida após alinhamento de mais de 5 000 sequências, leva em conta e combina a definição das regiões framework (FR) e das determinantes de complementaridade (CDR), dados estruturais provenientes de estudos de difração de raio-X e a caracterização das alças hipervariáveis. As delimitações das regiões FR-IMGT e CDR-IMGT foram definidas. Igualmente, a numeração única IMGT foi aplicada para o DOMÍNIO C e permite a delimitação precisa de domínios tipo Ig. O DOMÍNIO C corresponde à REGIÃO C completa, a maior parte da REGIÃO C ou a apenas parte da REGIÃO C, dependendo do tipo de imunoglobulina (IG).

[00074] A numeração IMGT para DOMÍNIO C (IG e TR) é derivada como a numeração única IMGT para DOMÍNIO V, a partir do princeps da numeração única IMGT para REGIÃO V, até a posição 104. As posições de aminoácidos podem, portanto, ser facilmente comparadas entre o DOMÍNIO C e o DOMÍNIO V.

[00075] Para situar precisamente as regiões De articulação, a numeração IMGT do DOMÍNIO C foi aplicada para localizar precisamente os domínios CH1 e CH2. A região De articulação inclui todos os resíduos de aminoácido inseridos entre o último resíduo de IMGT-CH1 e o primeiro resíduo de IMGT-CH2.

[00076] Todos os outros esquemas de numeração de imunoglobulinas, tais como de Kabat ou A. Honegger, abrangendo o mesmo domínio De articulação, estão incluídos na presente invenção.

[00077] A título de exemplo preferido da invenção, com base no sistema de numeração IMGT descrito acima, as sequências de aminoácidos da região de articulação de uma IgG1 compreende os resíduos H1 a H14, com o segmento H1 a H9 correspondendo à região De articulação Superior e o segmento H10 a H14 correspondendo à região De articulação Central. Mais especificamente, a região de articulação de IgG1 humana compreende a sequência de aminoácidos PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID No. 11), e a região de articulação de IgG1 murina compreende a sequência de aminoácidos PRDCGCKPCICT (SEQ ID No. 14).

Tabela 1

Região de articulação	Numeração	Hu-IgG1 (SEQ ID No. 11)	Mu-IgG1 (SEQ ID No. 14)	Hu-IgG2 (SEQ ID No. 7)	Hu-IgG4 (SEQ ID No. 11)
Articulação superior	H1	P	P	-	-
	H2	K	R	R	S
	H3	S	D	K	K
	H4	C	C	C	Y
	H5	D	G	-	-
	H6	K	-	-	-

	H7	T	C	C	G
	H8	H	K	V	P
	H9	T	P	E	P
Articulação central	H10	C	C	C	C
	H11	P	I	P	P
	H12	P	-	P	S
	H13	C	C	C	C
	H14	P	T	P	P

[00078] Em uma concretização preferida da invenção, é considerada uma modificação visando reduzir a extensão da sequência proteica codificada para a região de articulação de um anticorpo divalente. Mais especificamente, o processo de acordo com a invenção compreende uma etapa de deleção de pelo menos um aminoácido na região de articulação.

[00079] Como previamente mencionado, é preferida a deleção de no máximo 2 aminoácidos da referida região de articulação.

[00080] Como previamente mencionado, é preferida a deleção de no máximo 3 aminoácidos da referida região de articulação.

[00081] Como previamente mencionado, é preferida a deleção de no máximo 4 aminoácidos da referida região de articulação.

[00082] Em um uso específico do processo da invenção, a modificação consiste em deletar pelo menos um aminoácido selecionado a partir do aminoácido na posição H1, H2, H3, H5, H6, H7, H8, H9, H11, H12 ou H14.

[00083] Mais especificamente, os inventores demonstraram que a implicação de um determinado resíduo e de uma determinada modalidade inventiva consiste na seleção de certos resíduos.

[00084] No caso preferido de IgG1, o aminoácido na posição H1 consiste em Prolina, 1, o aminoácido na posição H2 consiste em Lisina na versão humana e em Arginina na versão murina; 1, o aminoácido

na posição H3 consiste em Serina na versão humana e em Aspartato na versão murina; o aminoácido na posição H5 consiste em Aspartato na versão humana e em Glicina na versão murina; o aminoácido na posição H6 consiste em Lisina; o aminoácido na posição H8 consiste em Histidina na versão humana e em Lisina na versão murina; o aminoácido na posição H9 consiste em Treonina na versão humana e em Prolina na versão murina; o aminoácido na posição H11 consiste em Prolina na versão humana e em Isoleucina na versão murina e o aminoácido na posição H12 consiste em Prolina na versão humana.

[00085] De acordo com uma concretização mais preferida, esta deleção foi efetuada na região "de articulação superior".

[00086] Em uma concretização mais preferida, esta deleção é parte da região "de articulação superior" constituído para uma IgG1, por exemplo, pelos aminoácidos H1 a H9, por comparação à região "de articulação central", constituída pelos aminoácidos H10 a H14.

[00087] No presente pedido de patente, a numeração de aminoácidos é feita com referência ao sistema IMGT, conforme previamente descrito. É óbvio que qualquer outro sistema de numeração, com modificação da numeração, porém não da natureza do resíduo implicado na região de articulação, deve ser considerado equivalente. A título de exemplo, a numeração da parte identificada de aminoácidos da invenção (de acordo com o sistema IMGT) no sistema de Kabat deve ser considerada equivalente.

[00088] Outro aspecto da invenção tem como base a deleção de pelo menos uma Cisteína na região "de articulação superior", de preferência situada na posição H4.

[00089] Outro aspecto da invenção tem como base a adição de pelo menos uma ponte dissulfeto na região de articulação.

[00090] Mais especificamente, o processo da invenção é caracterizado em que a modificação consiste na introdução de pelo

menos uma Cisteína na região "de articulação superior".

[00091] De acordo com os inventores, uma explicação plausível tem como base uma possível "rigidificação" da articulação, resultante da redução da extensão e/ou da introdução de outra ponte dissulfeto. Esta "rigidificação" permitirá manter uma conformação espacial apropriada do anticorpo com, como consequência, atividade antagonista melhorada.

[00092] É claro que qualquer método visando tornar a região de articulação mais rígida deverá ser considerado um método equivalente ao processo de acordo com a presente invenção.

[00093] A introdução de Cisteína pode ser realizada por adição deste aminoácido, a referida adição sendo efetuada por qualquer método conhecido por aquele versado no estado da técnica.

[00094] Outra maneira preferida para introduzir Cisteína na região de articulação consiste em substituir pelo menos um aminoácido.

[00095] Mais especificamente, uma maneira preferida para introduzir Cisteína na região de articulação consiste em substituir pelo menos um aminoácido selecionado a partir de H1 a H9. Tal substituição pode ser realizada por qualquer método conhecido pelo técnico versado no assunto.

[00096] Mais especificamente, o processo da invenção compreende a substituição da Treonina na posição H7 na região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[00097] Em outra concretização, o processo da invenção compreende a substituição da Lisina na posição H6 na região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[00098] Em ainda outra concretização, o processo da invenção compreende a substituição da Prolina na posição H1 da região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[00099] Em ainda outra concretização, o processo da invenção

compreende a substituição da Lisina na posição H2 da região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[000100] Em ainda outra concretização, o processo da invenção compreende a substituição da Serina na posição H3 da região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[000101] Em ainda outra concretização, o processo da invenção compreende a substituição do Aspartato na posição H5 da região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[000102] Em ainda outra concretização, o processo da invenção compreende a substituição da Histidina na posição H8 da região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[000103] Em ainda outra concretização, o processo da invenção compreende a substituição da Treonina na posição H9 da região "de articulação superior" por uma Cisteína.

[000104] De acordo com outra concretização, é possível também reduzir a extensão da região de articulação e/ou adicionar uma ponte dissulfeto trocando toda a sequência de aminoácidos codificadora para a região de articulação.

[000105] A título de exemplo preferido, a modificação do processo da invenção consiste em substituir os aminoácidos H1 a H14 da região de articulação da IgG1 pelos aminoácidos H1 a H14 da região de articulação de uma IgG2, de preferência quando o referido anticorpo monoclonal cuja atividade antagonista se deseja melhorar é um anticorpo IgG1.

[000106] Em outra aplicação, a invenção refere-se a um processo de rastreamento de um anticorpo monoclonal antagonista direcionado contra uma molécula-alvo específico, ou um fragmento funcional divalente ou derivado deste, o referido anticorpo sendo capaz de inibir uma ou mais das atividades biológicas da referida molécula-alvo, em que o referido processo compreende as etapas de:

[000107] (a) selecionar um anticorpo inicial com nível inicial de inibição da referida única ou mais atividades biológicas da referida molécula-alvo,

[000108] (b) modificar a sequência de aminoácidos da região de articulação do referido anticorpo inicial pelo processo da invenção,

[000109] (c) avaliar o anticorpo modificado da etapa (b) quanto a sua capacidade para inibir a referida única ou mais atividades biológicas da referida molécula-alvo e

[000110] (d) selecionar, em resultado positivo, o anticorpo da etapa (c) com nível de inibição da referida única ou mais atividades biológicas da referida molécula-alvo mais alta do que o nível inicial da referida inibição.

[000111] Anticorpos iniciais podem ser selecionados entre os anticorpos existentes, tais como, entre outros, anticorpos antagonistas contra IGF-1R, c-Met, RON, Ax1, CD151, VEGF, VEGFR, Her-2neu, homodímeros e heterodímeros da família ErbB. Exemplos preferidos não restritivos para os referidos anticorpos iniciais podem incluir Herceptina, Pertuzumabe, Cetuximabe, anticorpos anti-VEGFR ou anti-IGF-1R.

[000112] "Nível de inibição", dentro do significado da invenção, ilustra a atividade antagonista de um anticorpo. Este nível de inibição pode ser determinado por qualquer método conhecido por aquele versado na técnica tal como, entre outros, a) contagem direta de células ou uso de $^3\text{[H]}$ Timidina, sais de tetrazolina ou qualquer outro meio fluorescente para avaliar a proliferação, b) Ensaios de rastreamento por Western Blotting, ELISA de rastreamento de fósforo ou alfa para monitorar transdução de sinal, c) análise por BRET ou FRET para ensaio de dimerização, d) microscopia ou métodos fluorescentes para monitorar migração, invasão, angiogênese ou morfogênese e e) medição de tumores com paquímetro para

avaliações in vivo.

[000113] Este processo de rastreamento pode ser utilizado para a melhora de anticorpos validados ou como estágio de seleção para pesquisa ou de anticorpos pré-clínicos.

[000114] Outro aspecto de acordo com a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal direcionado contra uma molécula-alvo específica, ou fragmentos funcionais divalentes ou derivados deste, a serem obtidos pelo processo da invenção, o referido anticorpo sendo caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de aminoácidos na região de articulação selecionada a partir do grupo constituído por:

SEQ ID No. 1 (PRDCGCKPCICT), SEQ ID No. 2

(PKSCGCKPCICT), SEQ ID No. 3 (PKSCGCKPCICP), SEQ ID No. 4 (PRDCGCKPCPPCP), SEQ ID No. 5 (PRDCGCHTCPPCP), SEQ ID No. 6 (PKSCDCHCPCPPCP), SEQ ID No. 7 (RKCCVECPCPPCP), SEQ ID No. 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 24 (PKCCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 25 (PKSCCKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 26 (PKSCDCTHTCPCPPCP) SEQ ID No. 27 (PKSCDKCHTCPCPPCP), SEQ ID No. 28 (PKSCDKTCTCPCPPCP), SEQ ID No. 29 (PKSCDKTHCCPCPPCP), SEQ ID No. 30 (PKSCDKTHTCCPCPPCP), SEQ ID No. 31 (PKSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 32 (PKSCDKTHTCPCPPCC), SEQ ID No. 33 (PSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 34 (PKSCDTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 35 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEQ ID No. 36 (KCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 37 (PSCKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 38 (PKSCDTHCPCPPCP), SEQ ID No. 39 (PKSCTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 40 (PKSCDKTTCPCP), SEQ ID No. 41 (PKSCDKTHCPCPPC), SEQ ID No. 42 (PKSCDCHTCPCPPCP), SEQ ID No. 43 (PKSCDCTHCPCPPCP), SEQ ID No. 44

(PCSCKHTCPCPPCP), SEQ ID No. 45 (PSCCTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 46 (PSCDKHCCPCPPCP), SEQ ID No. 47 (PKSTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 48 (PKSCTCPCPPCP) or SEQ ID No. 49 (PKSCDKCVECPCPPCP).

[000115] Um anticorpo monoclonal preferido obtido pela implantação do processo da invenção pode ser caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do

grupo constituído por:

SEQ ID No. 1 (PRDCGCKPCICT), SEQ ID No. 2

(PKSCGCKPCICT), SEQ ID No. 3 (PKSCGCKPCICP), SEQ ID No. 4 (PRDCGCKPCPPCP), SEQ ID No. 5 (PRDCGCHTCPPCP), SEQ ID No. 6 (PKSCDCHCPCPPCP), SEQ ID No. 7 (RKCCVECPCPPCP), SEQ ID No. 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 24 (PKCCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 25 (PKSCCKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 26 (PKSCDCTHTCPCPPCP) SEQ ID No. 27 (PKSCDKCHTCPCPPCP), SEQ ID No. 28 (PKSCDKTCTCPCPPCP), SEQ ID No. 29 (PKSCDKTHCCPCPPCP), SEQ ID No. 30 (PKSCDKTHTCCPCPPCP), SEQ ID No. 31 (PKSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 32 (PKSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 33 (PSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 34 (PKSCDTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 35 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEQ ID No. 36 (KCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 37 (PCKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 38 (PKSCDTHCPCPPCP), SEQ ID No. 39 (PKSCTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 40 (PKSCDKTTCPCPPCP), SEQ ID No. 41 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEQ ID No. 42 (PKSCDCHTCPCPPCP), SEQ ID No. 43 (PKSCDCTHCPCPPCP), SEQ ID No. 44 (PCKCKHTCPCPPCP), SEQ ID No. 45 (PSCCTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 46 (PSCDKHCCPCPPCP), SEQ ID No. 47 (PKSTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 48 (PKSCTCPCPPCP) or SEQ ID No. 49 (PKSCDKCVECPCPPCP).

[000116] Em uma concretização preferida, o referido anticorpo monoclonal é um anticorpo humano, mais preferido, é um anticorpo IgG1.

[000117] A invenção refere-se também a um ácido nucleico isolado que codifica para um anticorpo monoclonal conforme previamente descrito, ou seja, compreendendo uma sequência de aminoácidos na região de articulação selecionada a partir do grupo constituído por:

SEQ ID No. 1 (PRDCGCKPCICT), SEQ ID No. 2

(PKSCGCKPCICT), SEQ ID No. 3 (PKSCGCKPCICP), SEQ ID No. 4 (PRDCGCKPCPPCP), SEQ ID No. 5 (PRDCGCHTCPPCP), SEQ ID No. 6 (PKSCDCHCPCPPCP), SEQ ID No. 7 (RKCCVECPCPPCP), SEQ ID No. 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP), SEQ ID No. 24

(PKCCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 25 (PKSCCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 26 (PKSCDCTHTCPPCP), SEQ ID No. 27 (PKSCDKCHTCPPCP), SEQ ID No. 28 (PKSCDKTCTCPPCP), SEQ ID No. 29 (PKSCDKTHCCPPCP), SEQ ID No. 30 (PKSCDKTHTCCPPCP), SEQ ID No. 31 (PKSCDKTHTCPCCP), SEQ ID No. 32 (PKSCDKTHTCPPCC), SEQ ID No. 33 (PSCDKTHTCPPCP), SEQ ID No. 34 (PKSCDTHTCPPCP), SEQ ID No. 35 (PKSCDKTHCPPCP), SEQ ID No. 36 (KCDKTHTCCPPCP), SEQ ID No. 37 (PSCCKTHTCPPCP), SEQ ID No. 38 (PKSCDTHCPPCP), SEQ ID No. 39 (PKSCTHTCPPCP), SEQ ID No. 40 (PKSCDKTTCP), SEQ ID No. 41 (PKSCDKTHCPPC), SEQ ID No. 42 (PKSCDCHTCCPPCP), SEQ ID No. 43 (PKSCDCTHCPPCP), SEQ ID No. 44 (PSCCKHTCPPCP), SEQ ID No. 45 (PSCCTHTCPPCP), SEQ ID No. 46 (PSCDKHCCPPCP), SEQ ID No. 47 (PKSTHTCPPCP), SEQ ID No. 48 (PKSCTCPPCP) or SEQ ID No. 49 (PKSCDKCVECPCP).

[000118] De acordo com ainda outra modalidade, a presente invenção refere-se a um ácido nucleico isolado, caracterizado em que este é escolhido a partir dos seguintes ácidos nucleicos:

a) ácido nucleico, DNA ou RNA, codificador de uma região de articulação artificial de acordo com a invenção, o ácido nucleico RNA correspondente deste ou a sequência complementar deste;

b) sequência isolada de ácido nucleico, compreendendo uma sequência nucleica selecionada a partir do grupo constituído pela SEQ ID No. 15 a SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 50 a SEQ ID No. 77, o ácido nucleico RNA correspondente desta e a sequência complementar desta; e

c) ácido nucleico contendo pelo menos 18 nucleotídeos capazes de se hibridizarem sob condições de alto rigor com pelo menos uma das sequências SEQ ID. Nos. 15 a 21 e 50 a 77.

[000119] De preferência, a invenção compreende um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo constituído pela SEQ ID No. 15 a SEQ ID No. 21 e SEQ ID No. 50 a SEQ ID No. 77.

[000120] A invenção também integra um vetor de expressão ou célula hospedeira transformada, compreendendo um ácido nucleico isolado, como previamente descrito, e, mais especialmente, um ácido

nucleico isolado compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo constituído pela SEQ ID No. 15 a SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 50 a SEQ ID No. 77, o ácido nucleico RNA correspondente desta e a sequência complementar desta.

[000121] Por ácido nucleico, sequência nucleica ou de ácido nucleico, polinucleotídeo, oligonucleotídeo, sequência de polinucleotídeos, sequência de nucleotídeos, termos que serão empregados indiferentemente na presente invenção e que se destinam a indicar neste relatório descritivo uma ligação precisa de nucleotídeos, os quais estão modificados ou não, permitindo que um fragmento ou região de um ácido nucleico seja definido, contendo ou não nucleotídeos não naturais e sendo capaz de corresponder muito bem a um DNA de fita dupla, um DNA de fita simples, bem como aos produtos de transcrição dos referidos DNAs.

[000122] Deve ser também entendido que a presente invenção não diz respeito às sequências de nucleotídeos em seu ambiente cromossômico natural, ou seja, no estado natural. A invenção está relacionada com sequências que foram isoladas e/ou purificadas, ou seja, que foram selecionadas direta ou indiretamente, por exemplo, por cópia, seu ambiente tendo sido pelo menos parcialmente modificado. Destina-se, portanto, a indicar, neste relatório descritivo, os ácidos nucleicos isolados obtidos por recombinação genética por meio, por exemplo, de células hospedeiras, ou aqueles obtidos por síntese química.

[000123] Uma hibridização sob condições de alto rigor significa que as condições de temperatura e de força iônica são escolhidas em tal maneira que permitam manter a hibridização entre dois fragmentos de DNA complementar. A título de ilustração, condições de alto rigor da etapa de hibridização para fins de definir os fragmentos de polinucleotídeos descritos acima são vantajosamente as seguintes.

[000124] A hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA é conduzida em duas etapas: (1) pré-hibridização a 42°C por 3 horas em tampão fosfato (20 mM, pH 7,5), contendo 5 x SSC (1 x SSC corresponde a uma solução de NaCl 0,15 M + citrato de sódio 0,015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10 x solução de Denhardt, 5% de sulfato de dextrano e 1% de DNA de espermatozoides de salmão; (2) real hibridização por 20 horas a uma temperatura que depende do tamanho da sonda (ou seja, 42°C, para tamanho de sonda > 100 nucleotídeos), seguido por 2 lavagens de 20 minutos a 20°C em 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavagem de 20 minutos a 20°C em 0,1 x SSC + 0,1% de SDS. A última lavagem é realizada em 0,1 x SSC + 0,1% de SDS por 30 minutos a 60°C para tamanho de sonda > 100 nucleotídeos. As condições de hibridização de alto rigor descritas acima para um polinucleotídeo de tamanho definido podem ser adaptadas por aquele versado no estado da técnica para oligonucleotídeos de tamanho maior ou menor, de acordo com o ensinamento de Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor).

[000125] A invenção refere-se igualmente a um vetor compreendendo um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[000126] A invenção visa especialmente vetores de clonagem e/ou de expressão que contenham uma sequência de nucleotídeos de acordo com a invenção.

[000127] Os vetores de acordo com a invenção contêm elementos, de preferência, que permitam a expressão e/ou a secreção das sequências traduzidas de nucleotídeos em uma determinada célula hospedeira. O vetor precisa, portanto, conter um promotor, sinais de iniciação e terminação de tradução, bem como regiões apropriadas de regulação de transcrição. Deve ser capaz também de ser mantido em

maneira estável na célula hospedeira e poder conter opcionalmente sinais particulares que especifiquem a secreção da proteína traduzida. Estes diferentes elementos são escolhidos e otimizados por aquele versado no estado da técnica em função da célula hospedeira utilizada. Para tanto, as sequências de nucleotídeos de acordo com a invenção podem ser inseridas em vetores de replicação autônoma no hospedeiro escolhido, ou serem vetores integrativos do hospedeiro escolhido.

[000128] Estes vetores são preparados por métodos correntemente utilizados por aquele versado no estado da técnica, e os clones resultantes podem ser introduzidos em um hospedeiro apropriado por métodos padrão, tais como lipofecção, eletroporação, choque térmico ou métodos químicos.

[000129] Os vetores de acordo com a invenção são, por exemplo, vetores de origem plasmídica ou viral. São úteis para transformar células hospedeiras com a finalidade de clonar ou expressar as sequências de nucleotídeos de acordo com a invenção.

[000130] A invenção compreende igualmente as células hospedeiras transformadas ou compreendendo um vetor de acordo com a invenção.

[000131] A célula hospedeira pode ser escolhida a partir de sistemas procarióticos ou eucarióticos, por exemplo, células bacterianas, porém igualmente células de levedura ou células de animais, especialmente, células de mamíferos. É do mesmo modo possível utilizar células de insetos ou células de plantas.

[000132] Outras características e vantagens da invenção surgem na continuação da descrição com os exemplos e as figuras em que:

[000133] Figuras 1A e 1B: Efeito de uma série de Mabs anti-c-Met murinos e correspondentes quiméricos, produzidos como isotipo de IgG1 humana/kappa sobre fosforilação de receptores c-Met em células

A549.

[000134] Figura 1A: Efeito agonista calculado em percentual em comparação à estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000135] Figura 1B: efeito antagonista calculado em percentual de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000136] Figuras 2A e 2B: Comparação entre Mab 224G11 murino e Mabs 224G11 quiméricos contendo várias regiões de articulação engenheiradas, sobre fosforilação de receptores c-Met em células A549

[000137] Figura 2A: Efeito agonista calculado em percentual em comparação à estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000138] Figura 2B: efeito antagonista calculado em percentual de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000139] Figuras 3A e 3B, 4 e 5: Modelos de dimerização e ativação de c-Met por BRET.

[000140] Figuras 6A e 6B: Reconhecimento de c-Met por formas quiméricas e humanizadas de 224G11.

[000141] Figuras 7A, 7B e 7C: Efeito de anticorpos murinos e quiméricos sobre proliferação de células NCI-H441 *in vitro*, induzida por HGF. Células NCI-H441 foram semeadas em meio sem soro. Vinte e quatro horas após a semeadura (figura 7A), m11E1 e [11E1] chim (figura 7B), m227H1 e [227H1] chim Ou (figura 7C) m224G11 e [224G11] chim foram adicionados em ausência ou em presença de HGF. Setas pretas indicam as cavidades semeadas apenas com células, quer em ausência ↙ ou em presença ↘ de HGF. Uma IgG1 murina (mIgG1) foi introduzida como controle de isotipo.

[000142] Figura 8: Comparação *in vivo* de Mabs 224G11 murino e quimérico no modelo de xenoenxerto de NCI-H441.

[000143] Figuras 9A e 9B: Efeito do anticorpo 244G11 murino e de várias versões quiméricas e humanizadas deste anticorpo sobre proliferação de células NCI-H441 *in vitro*, induzida por HGF. Células NCI-H441 foram semeadas em meio sem soro. Vinte e quatro horas após a semeadura, anticorpos a serem testados foram adicionados em ausência ou em presença de HGF. No painel (figura 9A), o m224G11 murino, IgG1 quimérica [224G11] chim, versões humanizadas de IgG1 [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3] são mostrados. No painel (figura 9B), o m224G11 murino e várias formas de IgG1 quimérica ([224G11] chim, [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim], [224G11] [TH7 chim]) foram apresentados. Setas pretas indicam as cavidades semeadas apenas com células, quer em ausência ✓ ou em presença ✗ de HGF. Uma IgG1 murina (mIgG1) foi introduzida como controle negativo para atividade agonista. O m5D5 foi utilizado como controle de agonista completo dose-dependente.

[000144] Figura 10: Efeito do Mab 244G11 murino e de várias versões quiméricas e humanizadas deste anticorpo sobre proliferação de células NCI-H441 *in vitro*, induzida por HGF. Células NCI-H441 foram semeadas em meio sem soro. Vinte e quatro horas após a semeadura, anticorpos a serem testados foram adicionados em ausência ou em presença de HGF. No painel (figura 9A), o m224G11 murino, formas quiméricas de IgG1 ([224G11] chim, [224G11] [TH7 chim]) e [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3] foram apresentados. Setas pretas indicam as cavidades semeadas apenas com células, quer em ausência ✓ ou em presença ✗ de HGF. Uma IgG1 murina (mIgG1) foi introduzida como controle negativo para atividade agonista. O m5D5 foi utilizado como controle de agonista

completo dose-dependente.

[000145] Figuras 11A-11B e 12A-12B: Efeito de uma série de Mabs anti-c-Met, com região de articulação engenheirada, da invenção sobre fosforilação de receptores c-Met em células A549.

[000146] Figura 11A e 11B: Efeito agonista calculado em percentual em comparação à estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000147] Figura 12A e 12B: efeito antagonista calculado em percentual de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000148] Figura 13A e 13B: Modelos de dimerização e ativação de c-Met por BRET.

[000149] Figura 14A: Efeito agonista calculado em percentual em comparação à estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000150] Figura 14B: efeito antagonista calculado em percentual de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF (100 ng/mL).

[000151] Figura 15: Modelos de dimerização e ativação de c-Met por BRET.

[000152] Figura 16: Análise microscópica do efeito de diferentes formas de Mab 214B2 sobre adesão de células PC3.

[000153] Figura 17: Análise do efeito de diferentes formas de Mab 214B2 sobre adesão de células PC3, utilizando um ensaio para ATP. Em cada cavidade, o número de células aderidas foi determinado utilizando uma curva padrão para PC3, de 0 a 200 000 células/cavidade. Os resultados são apresentados como segue: as células não tratadas são consideradas de referência (100%), e as células tratadas são apresentadas em termos de o % da referência.

[000154] Exemplo 1: Construção de Mabs quiméricos e avaliação

funcional do status de fosforilação de receptores c-Met

[000155] Vários Mabs de camundongo, direcionados contra um protótipo de receptor tirosina quinase (receptor c-Met) foram reformatados como Mabs quiméricos carreando domínios variáveis de camundongo e domínios constantes humanos. Suas atividades intrínsecas foram analisadas com base em um ensaio funcional monitorando a inibição de fosforilação de receptores c-Met dependente de ligante (HGF).

[000156] Após clonagem por PCR de sequências de domínio variável de camundongo (VH, VL), Mabs quiméricos foram engenheirados mediante a ligação de um fragmento de restrição {Nhe1-Bcl1}, carreando sequências VH ou VL de camundongo, em um vetor pCEP4 (Invitrogen, EUA) contendo toda a sequência de codificação do domínio constante de uma cadeia leve humana Ckappa ou uma cadeia pesada humana [CH1-Articulação-CH2-CH3] de uma imunoglobulina IgG1. Todas as etapas de clonagem foram realizadas de acordo com técnicas convencionais de biologia molecular como descritas no manual Laboratory (Sambrook e Russel, 2001), ou de acordo com as instruções do fornecedor. Cada construção genética foi inteiramente validada por sequenciamento de nucleotídeos, usando o kit de sequenciamento de ciclo terminador Big Dye (Applied Biosystems, EUA), e analisada com Analisador 3100 Genetic (Applied Biosystems, EUA). A produção dos Mabs quiméricos correspondentes foi realizada com células HEK293 EBNA adaptadas em suspensão (Invitrogen, EUA), cultivadas em meio sem soro Excell 293 (SAFC Biosciences), suplementado com glutamina 6 mM. O processo de cultivo foi monitorado com base em viabilidade celular e produção de Mab. Os Mabs foram purificados empregando uma abordagem convencional de cromatografia em resina contendo Proteína A (GE Healthcare, EUA).

[000157] Todas as diferentes formas de Mabs foram produzidas em

níveis adequados com avaliações funcionais. Os níveis de produtividade variam tipicamente entre 15 e 30 mg/L de Mabs purificados.

[000158] As avaliações funcionais foram realizadas em células A549 de câncer de pulmão humano. O status de fosforilação de receptores c-Met foi monitorado em lisados celulares, usando um ensaio ELISA de captura específica. Um Mab anti-c-Met de cabra (R&D, ref. AF276) foi utilizado como anticorpo de captura, enquanto que o anticorpo de detecção correspondeu a um Mab anti-fosfo-c-Met (Biosource, ref. KHO0281). As leituras de luminescência foram registradas em leitor de placa multimodo Mithras LB920 (Berthold).

[000159] Todos os três Mabs murinos, 11E1, 224G11 e 227H1, resultaram em atividades intrínsecas comparáveis sobre fosforilação de receptor c-Met: quase nenhuma atividade agonista por si próprio (menos de 5% de efeito do HGF, Figura 1A) e forte inibição de fosforilação de receptor c-Met induzida por HGF [100 ng/mL] (Inibição em >70% do efeito de HGF, Figura 1B). De maneira bastante surpreendente, ao se modificar o domínio constante do Mab, trocando de IgG1/kappa de camundongo para IgG1 kappa humana, uma modificação completa das atividades intrínsecas dos Mabs quiméricos resultantes foi observada (Figuras 1A-1B). De fato, forte agonismo foi observado (atingindo 20% do efeito de HGF para c11E1, Figura 1A) foi observado associado com uma importante redução na eficácia antagonista (restando apenas 60% de inibição do efeito de HGF para c224G11, Figura 1B). Este efeito independeu do domínio variável do anticorpo uma vez que o mesmo fenômeno foi observado para os três Mabs investigados (os anticorpos monoclonais 11E1, 224G11 e 227H1 são secretados pelo hibridoma depositado na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos) (Institut Pasteur, Paris, França) em 14/03/2007

sob os números CNCM I-3724 (correspondente a 11E1), I-3731 (correspondente a 224G11) e I-3732 (correspondente a 227H1) (consultar a publicação do pedido de patente PCT sob o número WO 2009/007427).

[000160] Exemplo 2: Desenho, clonagem e produção de versões de articulação engenheiradas

[000161] Com base na observação feita acima, foi levantada a hipótese de que o perfil farmacológico comprometido observado quando da reformação de IgG1 de camundongo para Mabs humanos IgG1 teria sido provocado pelo domínio da IgG1 humana.

[000162] Por um lado, sabia-se na literatura que a ativação do receptor c-Met estava associada com sua dimerização e que a inibição da dimerização do receptor c-Met pode inibir a sua fosforilação e sinalização em sentido descendente.

[000163] Por outro lado, Mabs por essência são moléculas divalentes em virtude de sua base estrutural inerente e, portanto, podem agir como indutores da dimerização de receptores c-Met.

[000164] Por conseguinte, foi levantada a hipótese de que restringindo a flexibilidade conformacional de Mabs quiméricos, como rotação, dobramento ou deformação angular tipo "wagging" (consultar Roux et al., 1997), poderia ser possível reaver as atividades intrínsecas de interesse (forte antagonismo e fraco agonismo) dos Mabs murinos precursores. Esta hipótese é reforçada pela análise das respectivas sequências de região de articulação de IgG1 de camundongo e da humana (também denominada região H de IgG1):

Região H de IgG1 de camundongo	PRDCGCKPCICT	SEQ ID No. 1
Região H de IgG1 de camundongo	PKSCDKTHTCPPCP	SEQ ID No. 11
Região H de IgG2 de camundongo	RKCCVECPPCP	SEQ ID No. 7

[000165] Este alinhamento mostra que a região H da IgG1 de camundongo é mais curta e contém uma ponte dissulfeto adicional (Cys), em comparação à região H da IgG1 humana. Além disso, indica que a região H da IgG2 humana se assemelha à região H da IgG1 de camundongos, tanto em extensão (11 AA) como em número de pontes dissulfeto (4).

[000166] Por conseguinte, é especulado se a rigidez da região H da IgG1 humana poderia ser aumentada se fossem introduzidas mutações estabilizadoras, tais como resíduos Cys e/ou ou se este segmento em particular fosse encurtado. Esta suposta rigidez aumentada da região H pode estar associada com propriedades funcionais melhoradas do Mab engenheirado de IgG1 humana.

[000167] Uma primeira série de 7 versões engenheiradas foi desenhada (Tabela 2), nas quais regiões H quiméricas foram produzidas pela troca de porções de articulação em N-terminal ou C-terminal entre sequências de camundongo e humanas. Uma IgG2 equivalente foi também engenheirada.

Tabela 2

WT-IgG2	WT-IgG ₁		Variantes					
Hu-IgG ₂	Hu-IgG ₁	Mu-IgG ₁	MH -IgG ₁	MMCH -IgG ₁	MMH -IgG ₁	MUP9H -IgG ₁	MUC7H -IgG ₁	TH7CΔ6,9 -IgG ₁
-	P	P	P	P	P	P	P	P
R	K	R	R	K	K	R	R	K
K	S	D	D	S	S	D	D	S
C	C	C	C	C	C	C	C	C
-	D	G	G	G	G	G	G	D
-	K	-	-	-	-	-	-	-
C	T	C	C	C	C	C	C	C
V	H	K	K	K	K	K	H	H
E	T	P	P	P	P	P	T	-
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	I	I	I	I	P	P	P
P	P	-	-	-	-	P	P	P
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	T	T	T	P	P	P	P

[000168] Uma série adicional de 28 mutantes na região H foi desenhada e engenheirada com a finalidade de avaliar a influência da introdução de um resíduo cisteína adicional dentro da região H, da

deleção de pelo menos um aminoácido ou de se combinar simultaneamente a adição de uma cisteína e a deleção de pelo menos um aminoácido dentro da região H.

[000169] Esta série inovadora de mutantes de articulação está descrita na Tabela 3.

Tabela 3

	Nº01	Nº02	Nº03	Nº04	Nº05	Nº06	Nº07	Nº08	Nº09	Nº10	Nº11	Nº12	Nº13	Nº14
C1	C	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C2	P	C	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C3	P	K	C	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C5	P	K	S	C	C	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C6	P	K	S	C	D	C	T	H	T	C	P	P	C	P
C7	P	K	S	C	D	K	C	H	T	C	P	P	C	P
C8	P	K	S	C	D	K	T	C	T	C	P	P	C	P
C9	P	K	S	C	D	K	T	H	C	C	P	P	C	P
C11	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	C	P	C	P
C12	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	C	C	P
C14	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	C
Δ2	P	-	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6	P	K	S	C	D	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ9	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ1-3	-	K	-	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ2-5	P	-	S	C	-	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6-9	P	K	S	C	D	-	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ5-6	P	K	S	C	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ8-11	P	K	S	C	D	K	T	-	T	C	-	P	C	P
Δ9-14	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	-
C7Δ6	P	K	S	C	D	-	C	H	T	C	P	P	C	P
C6Δ9	P	K	S	C	D	C	T	H	-	C	P	P	C	P
C2Δ5-7	P	C	S	C	-	K	-	H	T	C	P	P	C	P
C5Δ2-6	P	-	S	C	C	-	T	H	T	C	P	P	C	P
C9Δ2-7	P	-	S	C	D	K	-	H	C	C	P	P	C	P
Δ4-5-6	P	K	S	-	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ5-6-7-8	P	K	S	C	-	-	-	-	T	C	P	P	C	P
IgG1/IgG2	P	K	S	C	D	K	C	V	E	C	P	P	C	P

[000170] Como um exemplo de construção de região de articulação, o domínio variável (cadeias pesada e leve) de um Mab anti-c-Met de camundongo, denominado 224G11, foi escolhido.

[000171] Estas sequências de camundongo foram fundidas em primeira instância a domínios constantes humanos [Ckappa], para a cadeia leve, e [CH1-Articulação-CH2-CH3] para a cadeia pesada da IgG1 humana. A modificação da região de articulação foi realizada trocando um segmento de restrição {Nhe1-Bcl1} pela porção equivalente carreando as modificações desejadas, cada respectivo fragmento {Nhe1-Bcl1} sendo sintetizado por síntese gênica global (Genecust, LU). Todos os novos mutantes de articulação foram

engenheirados sobre a mesma base.

[000172] Todas as etapas de clonagem foram realizadas de acordo com técnicas convencionais de biologia molecular, conforme descritas no manual Laboratory (Sambrook e Russel, 2001) ou de acordo com as instruções do fornecedor. Cada construção genética foi integralmente validada por sequenciamento de nucleotídeos, usando o kit de sequenciamento de ciclo terminal Big Dye (Applied Biosystems, EUA) e analisadas com Analisador 3100 Genetic (Applied Biosystems, EUA).

[000173] Células HEK293 EBNA adaptadas em suspensão (Invitrogen, EUA) foram cultivadas como de rotina em frascos de 250 mL em 50 mL de meio Excell 293 sem soro (SAFC Biosciences), suplementado com glutamina 6 mM, em misturador orbital (velocidade de rotação: 110 rpm). A transfecção transitória foi realizada com 2,106 células/mL, usando polietilenoimina (PEI) de 25 kDa (Polysciences), preparada em água em concentração final de 1 mg/mL misturado e DNA de plasmídeo (concentração final de 1,25 µg/mL para razão de 1:1 de cadeia leve para pesada de plasmídeo). Após 4 horas da transfecção, a cultura foi diluída com um volume de meio de cultura fresco para se obter densidade celular final de 106 células/mL. O processo de cultivo foi monitorado com base viabilidade celular e produção de Mab. Tipicamente, as culturas foram mantidas por 4 a 5 dias. Os Mabs foram purificados empregando uma abordagem convencional de cromatografia em resina contendo Proteína A (GE Healthcare, EUA).

[000174] Todas as diferentes formas de Mabs foram produzidas em níveis adequados com avaliações funcionais. Os níveis de produtividade variam tipicamente entre 15 e 30 mg/L de Mabs purificados.

Exemplo 3: Avaliação dos Mabs engenheirados em ensaio ELISA

específico para fosfo-c-Met.

[000175] Células A549 foram semeadas em uma placa multicavidade (MV) de 12 cavidades em meio completo de crescimento [F12K + FCS 10%]. As células foram submetidas à privação por 16 horas antes de estimulação com HGF [100 ng/mL], e cada Mab a ser testado foi adicionado em sua concentração final de 30 µg/ml, 15 minutos antes que a estimulação com o ligante. Tampão de lise gelado foi adicionado 15 minutos depois da adição de HGF para interromper a reação de fosforilação. As células foram raspadas mecanicamente, e os lisados celulares foram coletados por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C e corresponderam à fase sobrenadante. O conteúdo proteico foi quantificado com kit BCA (Pierce) e armazenado a -20°C até o uso. O status de fosforilação de c-Met foi quantificado por ELISA. Um Mab anti-c-Met de cabra (R&D, ref. AF276) foi utilizado como anticorpo de captura (revestimento durante a noite a 4°C) e, após uma etapa de saturação com tampão TBS-BSA 5% (1 hora em temperatura ambiente (TA)), 25 µg de lisados de proteína foram adicionados a cada cavidade da placa 96MW revestida. Depois de 90 minutos de incubação em TA, as placas foram lavadas quatro vezes e o anticorpo de detecção foi adicionado (Mab anti-fosfo-c-Met direcionado contra os resíduos Tyr fosforilados nas posições 1230, 1234 e 1235). Após 1 hora adicional de incubação e 4 lavagens, um anticorpo anticoelho acoplado a HRP (Biosource) foi adicionado por 1 hora em TA, e a detecção de luminescência foi realizada adicionando Luminol. A luminescência foi lida em leitor de placa multímodo Mithras LB920 (Berthold).

[000176] Uma série de versões engenheiradas do domínio de articulação da cadeia pesada foi engenheirada e analisada no ensaio de fosforilação de receptor c-Met. Como mostrado na Figura 2A, comparado a 224G11[IgG1-Chim], uma importante redução do efeito

agonista associado com o isotipo hlgG1/kappa foi observada para a construção à base de IgG2 e para algumas versões engenheiradas de IgG1/kappa [MH, MUP9H e TH7], Figura 2A]. Atividades agonistas mais fracas e comparáveis foram obtidas com 24G11[MH-IgG1], contendo a região de articulação completa de IgG1 murina, e 224G11[TH7] contendo a mais região de articulação engenheirada de IgG1 humana. Um aumento concomitante em eficácia antagonista foi também obtido [Figura 2B]. Dessa forma, tanto o mutante à base de IgG2 como o mutante de articulação TH7 à base de hlgG1/kappa, associados com domínio variável de 224G11 murino, resultaram em atividades funcionais quase que semelhantes àquela do Mab 224G11 de camundongo. No entanto, a comparação de atividades agonista/antagonista de 224G11[MMCH-IgG1-chim] com 224G11[IgG1-chim] demonstrou que poderia a atividade antagonista poderia ser aumentada, pela construção de anticorpo, independentemente das propriedades agonistas intrínsecas deste anticorpo.

[000177] Uma segunda série de versões engenheiradas do domínio de articulação da cadeia pesada foi engenheirada e analisada no ensaio de fosforilação de receptor c-Met. De acordo com a Figura 11A, a substituição de aminoácido em domínio de articulação de cadeia pesada introduzindo resíduos cisteína modificou o efeito agonista de anticorpos. De fato, por um lado, algumas versões mutantes exibiram efeito agonista mais fraco do que c224G11, como por exemplo, c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6] ou c224G11[C7], enquanto outras, efeito agonista aumentado como c224G11[C11], c224G11 [C12] e c224G11[C14]. Além disso, deleções de aminoácidos no domínio de articulação da cadeia pesada, associadas ou não com substituições, modificaram também as propriedades agonistas dos anticorpos [Figura 11B]. Por exemplo,

C224G11[Δ1-3], c224G11[Δ4-5-6], c224G11[Δ5-6-7-8], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6] ou c224G11[C9Δ2-7] revelaram efeito agonista mais fraco do que c224G11, enquanto c224G11 [Δ8-11] exibiu efeito agonista mais forte. Da mesma forma que c224G11 [TH7], todas as novas versões exibindo efeito agonista mais fraco mostraram aumento concomitante em eficácia antagonista [Figura 12A e 12B], enquanto aquelas exibindo efeito agonista mais forte apresentaram eficácia antagonista mais fraca.

[000178] No presente pedido de patente, o uso de colchetes não é necessário e, a título de exemplo, a referência [224G11][IgG2chim] deve ser considerada idêntica a 224G11IgG2chim. Na mesma maneira, para indicar que o anticorpo é murino, a expressão murino ou a letra m pode ser adicionada; para indicar que o anticorpo é quimérico, a expressão chim ou a letra c pode ser adicionada; para indicar que o anticorpo é humanizado, a expressão hum ou a letra h pode ser adicionada. A título de exemplo, o anticorpo quimérico 224G11IgG2 pode estar referido como c224G11IgG2, c224G11[IgG2], c[224G11]IgG2, c[224G11][IgG2], 224G11IgG2chim, 224G11[IgG2chim], [224G11]IgG2chim ou [224G11][IgG2chim].

[000179] O símbolo Δ significa deleção.

Exemplo 4: Análise por BRET

[000180] Em um primeiro conjunto de experimentos, foi controlado que IgG1 de camundongo, IgG1 humana e IgG2 humana irrelevantes não apresentavam efeito de sinal BRET induzido por HGF em ambos os modelos BRET.(Figura 3). Esses Mabs foram utilizados ainda como controles.

[000181] O efeito de formas quiméricas de IgG1 de Mab 224G11 de camundongo ([224G11] chim), Mab 11E11 de camundongo ([11E1] chim) e de Mab 227H1 de camundongo ([227H1] chim) sobre

dimerização de c-Met e ativação de c-Met em modelo BRET foi então avaliado.

[000182] Enquanto o Mab 224G11 de camundongo inibiu 59% do sinal BRET induzido por HGF em modelo de dimerização de c-Met, o Mab [224G11] chim inibiu somente 29% (Figura 4). O anticorpo [224G11] chim foi também menos eficaz em inibir ativação de c-Met induzida por HGF uma vez que os anticorpos [224G11] chim e m224G11 inibiram o sinal de BRET induzido por HGF em 34,5% e 56,4% (Figura 5). Além disso, apenas m224G11 não apresentou efeito sobre ativação de c-Met, enquanto [224G11] chim obteve efeito agonista parcial sobre ativação de c-Met, correspondente a 32,9% do sinal induzido por HGF. Este efeito agonista parcial do [224G11] chim foi visto também no modelo BRET de dimerização de c-Met, uma vez que apenas [224G11] chim induziu aumento em BRET, correspondendo a 46,6% de sinal induzido por HGF, em comparação a 21,3% para m224G11.

[000183] A eficácia agonista da segunda série de versões engenheiradas do domínio de articulação da cadeia pesada foi avaliada em modelo BRET de ativação de c-Met (Figura 13A e 13B). Ao contrário de c224G11 que apresentou efeito agonista parcial sobre ativação de c-Met, diferentes formas quiméricas com articulação mutante do anticorpo 224G11, compreendendo substituição de aminoácido, deleção de aminoácido ou ambos, não exibiram efeito significativo sobre ativação apenas de c-Met para 224G11[C2], c224G11[C3], c224G11 [C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[Δ4-5-6], c224G11 [Δ5-6-7-8], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6] ou c224G11[C9Δ2-7], respectivamente. Em contraste, outras formas quiméricas com articulação mutante exibiram efeito agonista aumentado, como c224G11[Δ6], c224G11[C11], c224G11[C12] e

c224G11[C14].

Exemplo 5: Reconhecimento de c-Met por formas quiméricas e humanizadas de 224G11

[000184] Uma análise por ELISA direto foi definida para determinar a capacidade de ligação das várias formas quiméricas e humanizadas no c-Met recombinante. Resumidamente, c-Met dimérico recombinante da R&D Systems foi revestido em 1,25 µg/mL em placas Immulon II de 96 cavidades. Após incubação durante a noite a 4°C, as cavidades foram saturadas com solução de gelatina 5%/PBS. As placas foram então incubadas por 1 hora a 37°C, antes que fossem adicionados anticorpos a serem testados em diluições de duas vezes. As placas foram incubadas por mais 1 hora antes que fosse adicionado uma IgG anticumundongo de cabra conjugada com HRP para detectar o anticorpo murino, e um anti-kappa de cadeia leve humana de cabra conjugado com HRP para reconhecimento de anticorpos quiméricos e humanizados. As placas foram incubadas por uma hora e o substrato TMB Uptima para peroxidase foi adicionado por 5 minutos antes de neutralização com H₂SO₄. Os resultados apresentados nas Figuras 6A e 6B indicaram que todas as formas testadas eram comparáveis no que diz respeito a reconhecimento de c-Met.

Exemplo 6: Efeito de anticorpos murinos e quiméricos sobre proliferação de células NCI-H441 *in vitro* induzida por HGF

[000185] Células NCI-H441 da ATCC foram cultivadas como de rotina em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escócia, Reino Unido), FCS 10% (Invitrogen Corporation) e L-glutamina 1% (Invitrogen Corporation). Para ensaios de proliferação, as células foram divididas 3 dias antes do uso de modo que estivessem em fase confluyente de crescimento antes da semeadura. Células NCI-H441 foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em densidade de $3,75 \times 10^4$ células/cavidade em 200 µL de meio sem

soro (meio RPMI 1640 mais L-glutamina 1%). Vinte e quatro horas após a semeadura, os anticorpos a serem testados foram adicionados às células NCI-H441 e incubados a 37°C por trinta minutos antes de adicionar HGF em concentração final de 400 ng/mL (5 nM) por 142 horas adicionais. O intervalo de dose testado para cada anticorpo é de 10 a 0,0097 µg/mL (concentração final em cada cavidade). Neste experimento, Mab IgG1 murino foi adicionado como isotipo murino de controle, e os anticorpos testados foram: m224G11, m11E1, m227H1 e suas formas quiméricas de IgG1 humana, identificadas respectivamente como [224G11] chim, [11E1] chim e [227H1] chim. Placas semeadas apenas com células + / - HGF foram incluídas também. Em seguida, as células foram submetidas a um pulso de 0,25 µCi de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suécia) por 7 horas e 30 minutos. A magnitude de [³H]Timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido tricloroacético foi quantificado por contagem de cintilação líquida. Os resultados estão expressos em dados não transformados de cpm para avaliar melhor a atividade agonista intrínseca potencial que ocorreria com Mabs anti-c-Met quando adicionados isoladamente à célula tumoral.

[000186] Os resultados descritos nas figuras 7A, 7B e 7C demonstraram que, como previsto, os anticorpos não exibiram efeito agonista quando adicionados isoladamente a células cancerosas, independentemente da dose testada. Não foi observada inibição significativa da proliferação induzida por HGF com o isotipo de controle, no tocante às altas variações de com observadas para este isotipo de controle neste experimento. Quando adicionados isoladamente, nem m224G11 murino, nem m11E1 ou m227H1 exibiram efeito agonista, comparado ao Mab mIgG1 do isotipo de controle ou células isoladamente. Atividades antiproliferativas dose-dependente, atingindo 78%, 80% ou 80%, ocorreram respectivamente

para os Mabs m224G11, m11E1 ou m227H1 (Cálculo de inibição %: $100 - [(cpm \text{ de células} + cpm \text{ média de fundo de mlgG1 do Mab a ser testado}) \times 100 / (cpm \text{ média de células} + cpm \text{ média de apenas células-HGF})]$). Surpreendentemente, a forma quimérica destes 3 Mabs induziram um efeito agonista significativo dependente de dose, quando adicionados isoladamente, com estimulações de crescimento próximas daquela observada com HGF para [11E1] chim e [227H1] chim respectivamente. Para estes 2 anticorpos exibindo atividades agonistas intrínsecas especialmente altas, o efeito antagonista foi significativamente diminuído, com 53% e 21% de efeitos inibidores, comparados a 80% observados para as suas formas murinas. O efeito agonista observado com o [224G11] chim quimérico foi também do tipo dose-dependente, porém foi mais baixo do que aqueles observados para [11E1] chim e [227H1] chim. Contudo, este efeito agonista teve impacto sobre a inibição *in vitro* de proliferação induzida por HGF, a qual deslocou de 78%, para o m224G11 murino, para 50% para sua forma quimérica. A fim de determinar se esta atividade agonista intrínseca "mais baixa" era compatível com um efeito *in vivo* inalterado, ambos m224G11 e [224G11] chim foram produzidos para testes *in vivo*. Em estudos anteriores, a dose de 30 µg/camundongo demonstrou atividade significativa *in vivo*, portanto, esta dose foi selecionada para avaliação *in vivo*.

Exemplo 7: Comparação *in vivo* de Mabs 224G11 murino e quimérico no modelo de xenoenxerto de NCI-H441

[000187] NCI-H441 é derivada de adenocarcinoma papilar do pulmão, expressa altos níveis de c-Met e demonstra fosforilação constitutiva de c-Met RTK.

[000188] A fim de avaliar o efeito *in vivo* de anticorpos no modelo de xenoenxerto de NCI-H441, camundongos atímicos de seis a oito semanas de idade foram abrigados em gaiolas esterilizadas com filtro

na parte superior, mantidos em condições estéreis e tratados de acordo com as diretrizes francesas e europeias. Os camundongos foram injetados por via subcutânea com 9×10^6 células. Em seguida, seis dias após o implante celular, os tumores eram mensuráveis (aproximadamente 100 mm³), e os camundongos foram divididos em grupos de 6 com tumor de tamanho comparável e tratados inicialmente com uma dose de ataque de 60 µg/camundongo e, depois, duas vezes por semana com 1 mg/dose de cada anticorpo a ser testado. Os camundongos foram acompanhados para a observação de taxa de crescimento do xenoinxerto. O volume tumoral foi calculado pela fórmula: $\pi (Pi)/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$. Os resultados descritos na Figura 8 demonstram que o Mab murino desprovido de atividade agonista *in vivo* comporta-se, como previsto, como potente antagonista mesmo na dose baixa testada. Em contraste ao observado com o Mab murino, o quimérico exibiu uma atividade muito transitória *in vivo* e o tumor escapou completamente ao tratamento no D20 após a injeção das células. Este experimento demonstra claramente que o aumento de efeito agonista *in vitro* que resultou em redução de atividade antagonista foi responsável também por uma perda significativa *in vivo* de atividade antagonista.

Exemplo 8: Efeito do Mab 224G11 murino e de várias versões quiméricas e humanizadas deste anticorpo sobre proliferação induzida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*

[000189] Células NCI-H441 da ATCC foram cultivadas como de rotina em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escócia, Reino Unido), FCS 10% (Invitrogen Corporation) e L-glutamina 1% (Invitrogen Corporation). Para ensaios de proliferação, as células foram divididas 3 dias antes do uso de modo que estivessem em fase confluenta de crescimento antes da semeadura. Células NCI-H441 foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em

densidade de $3,75 \times 10^4$ células/cavidade em 200 μ L de meio sem soro (meio RPMI 1640 mais L-glutamina 1%). Vinte e quatro horas após a semeadura, os anticorpos a serem testados foram adicionados às células NCI-H441 e incubados a 37°C por trinta minutos antes de adicionar HGF em concentração final de 400 ng/mL (5 nM) por 142 horas adicionais. O intervalo de dose testado para cada anticorpo é de 10 a 0,0097 μ g/mL (concentração final em cada cavidade). Neste experimento, Mab IgG1 murino foi adicionado como isotipo murino de controle e controle negativo de agonista. Os anticorpos testados foram: i) m224G11, ii) suas formas quiméricas de IgG1 humana, identificadas respectivamente como [224G11] chim, [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim], [224G11] [TH7 chim], iii) suas formas humanizadas de IgG1, descritas respectivamente como [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3]. O anticorpo completo 5D5 da Genentech, comercialmente disponível na ATCC como linhagem celular de hibridoma, foi introduzido como controle positivo de agonista completo e, posteriormente, denominado m5D5. Em seguida, as células foram submetidas a um pulso de 0,25 μ Ci de [3 H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suécia] por 7 horas e 30 minutos. A magnitude de [3 H]Timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido tricloroacético foi quantificado por contagem de cintilação líquida. Os resultados estão expressos em dados não transformados de cpm para avaliar melhor a atividade agonista intrínseca potencial que ocorreria com Mabs anti-c-Met quando adicionados isoladamente à célula tumoral.

[000190] Os resultados descritos na figura 9A demonstraram que, como previsto, nem o isotipo de controle, nem o m224G11 exibiram efeito agonista sobre proliferação de NCI-H441. O isotipo de controle não teve efeito sobre proliferação celular induzida por HGF, enquanto

que m224G11 mostrou 66% de inibição quando adicionado na concentração final de 10 µg/mL. O m5D5 utilizado como controle de agonista revelou, como previsto, efeito de agonista completo dose-dependente quando adicionado isoladamente às células. Como já observado, o Mab [224G11] chim exibiu efeito agonista significativo dose-dependente e, atividade inibidora reduzida deste quimérico foi observada: 19% em vez de 66% para a forma murina. Quando adicionados isoladamente, os 3 Mabs IgG1 humanizados demonstraram efeitos agonistas dose-dependente, comparado à forma m224G11. [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2] e [224G11] [Hz3] apresentaram atividades antagonistas comparáveis de aproximadamente 46, 30 e 35%. Estas atividades são significativamente mais baixas do que a observada para m224G11. Na Figura 9B, várias formas quiméricas de IgG1 foram testadas. Comparadas à forma [224G11] chim, que exibiu efeito agonista dose-dependente quando adicionada isoladamente a células NCI-H441, as formas [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224g11] [MMCH chim] e [224G11] [TH7] não tiveram efeito agonista intrínseco significativo. A atividade antagonista destas formas foi mais alta do que a observada para o Mab m224G11 (57%) com inibições atingindo 79, 78, 84 e 93%, respectivamente para [224g11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224g11] [MMCH chim] e [224G11] [TH7].

Exemplo 9: Efeito *in vitro* de várias formas quiméricas e humanizadas de IgG1 do Mab 224G11

[000191] Células NCI-H441 da ATCC foram cultivadas como de rotina em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escócia, Reino Unido), FCS 10% (Invitrogen Corporation) e L-glutamina 1% (Invitrogen Corporation). Para ensaios de proliferação, as células foram divididas 3 dias antes do uso de modo que estivessem em fase confluenta de crescimento antes da semeadura. Células NCI-H441

foram semeadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em densidade de $3,75 \times 10^4$ células/cavidade em 200 μ L de meio sem soro (meio RPMI 1640 mais L-glutamina 1%). Vinte e quatro horas após a semeadura, os anticorpos a serem testados foram adicionados às células NCI-H441 e incubados a 37°C por trinta minutos antes de adicionar HGF em concentração final de 400 ng/mL (5 nM) por 142 horas adicionais. O intervalo de dose testado para cada anticorpo é de 10 a 0,0097 μ g/mL (concentração final em cada cavidade). Neste experimento, Mab IgG1 murino foi adicionado como controle negativo de fundo para atividade agonista, e os anticorpos testados foram: i) m224G11, ii) suas formas quiméricas de IgG1 humana, identificadas respectivamente como [224G11] chim, [224G11] [MH chim], [224G11] [TH7 chim], iii) suas formas humanizadas de IgG1, descritas como [224g11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. Cavidades semeadas com apenas células +/- HGF foram incluídas também. O anticorpo completo 5D5 da Genentech, comercialmente disponível na ATCC como linhagem celular de hibridoma, foi introduzido como controle positivo de agonista completo e, posteriormente, denominado m5D5. Em seguida, as células foram submetidas a um pulso de 0,25 μ Ci de [3 H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suécia) por 7 horas e 30 minutos. A magnitude de [3 H]Timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido tricloroacético foi quantificado por contagem de cintilação líquida. Os resultados estão expressos em dados não transformados de cpm para avaliar melhor a atividade agonista intrínseca potencial que ocorreria com Mabs anti-c-Met quando adicionados isoladamente à célula tumoral.

[000192] A figura 10 indicou que o Mab m224G11 exibiram o efeito inibidor habitual (74% de inibição). A forma quimérica de IgG1, [224g11] chim, teve, como previsto, efeito agonista intrínseco dose-dependente e efeito antagonista mais baixo comparado à forma

murina: 33% *versus* 74% de inibição. O [224G11] [TH7 chim] apresentou atividade agonista muito fraca neste experimento. Adicionalmente, exibiu alto efeito inibidor (81%), próximo àquele observado para o Mab murino. As 2 formas humanizadas não tiveram efeito agonista intrínseco e sua atividade antagonista foi próxima daquelas observadas para o Mab murino ou para o [224G11] [TH7 chim], com respectivamente 67% e 76% de inibição para [224G11] [TH7 Hz1] e [224G11] [TH7 Hz3].

Exemplo 10: Troca de isotipo para a região de articulação (TH7) engenheirada

[000193] A fim de avaliar a modulação de propriedades farmacológicas induzidas pela sequência de articulação [TH7], correspondente a PKSCDCHCPPCP, em cadeias principais de imunoglobulinas diferentes da IgG1 humana, os inventores transferiram geneticamente a sequência [TH7] descrita acima em cadeias principais de IgG2 e IgG4 humanas. A região de articulação foi modificada pela troca de um fragmento de restrição {NheI1-Bel1} pela porção equivalente carreando a modificação [TH7], o fragmento {NheI1-Bel1} sendo sintetizado por síntese gênica global (Genecust, LU). As etapas de clonagem foram realizadas de acordo com técnicas convencionais de biologia molecular como descritas no *manual Laboratory* (Samuel e Russel, 2001) ou de acordo as instruções do fornecedor. Cada construção genética foi integralmente validada por sequenciamento de nucleotídeos usando o kit de sequenciamento de ciclo terminador Big Dye (Applied Biosystems) e analisados com Analisador 3100 Genetic (Applied Biosystems). As sequências resultantes são descritas como SEQ ID Nos. 78, 79, 80 e 81, respectivamente para sequências de aminoácidos e de nucleotídeos dos isotipos IgG2 e IgG4 engenheiradas com TH7 (apenas a cadeia pesada, a cadeia leve era idêntica à de c224G11/Ckappa humana,

utilizada para todas as outras construções com base em IgG1). Estas construções inovadoras foram aplicadas ao Mab quimérico 224G11 anti-c-Met, como descrito acima no Exemplo 2.

[000194] Os anticorpos correspondentes engenheirados, c224G11[IgG2th7] e c224G11[IgG4th7], foram produzidos como descrito acima por expressão transitória em células HEK293 EBN adaptadas em suspensão.

Exemplo 11: Avaliação dos Mabs engenheirados c224G11[IgG2TH7] e c224G11 [IgG4TH7] em ensaio ELISA específico para fosfo-c-Met e ensaio BRET.

[000195] A articulação TH7 foi introduzida também em Mabs quiméricos 224G11 IgG2 e IgG4 e testada no ensaio de fosforilação de receptor c-Met. Como mostrado em 14A e 14B, c224G11[IgG2TH7] e c224G11[IgG4TH7] induziram apenas leve efeito agonista, porém significativamente mais fraco do que Mab c224G11, e exibiram efeito antagonista comparável à forma murina do Mab 224G11 (m224G11). Esse resultado foi confirmado em modelo BRET de ativação de c-Met (Figura 15), no qual c224G11[IgG2TH7] e c224G11 [IgG4TH7] revelaram também ser agonista mais fraco do que Mab c224G11.

[000196] Portanto, a mutação de articulação TH7 introduzida em formato de IgG2 ou IgG4 de Mab deu origem a anticorpos funcionais com propriedades semelhantes a c224G11[TH7].

Exemplo 12: Ensaio de adesão celular

[000197] Células PC3 de câncer de próstata foram destacadas de placas com tripsina, lavadas 3 vezes com meio F12k sem soro e novamente suspensas no mesmo meio. As células (100.000 células/cavidade) foram semeadas em placas de 96 cavidades, revestidas com Laminin 1 a 1 µg/mL. As formas a seguir do Mab anti-CD151 a ser testado foram adicionadas simultaneamente na concentração final de 10 µg/mL: o Mab IgG1 murino m214B2, a forma de anticorpo

quimérico não modificado IgG1 denominado c214B2 e a forma de anticorpo quimérico IgG1 com a modificação TH7 denominado cTH7-214B2.

[000198] CD151 é uma proteína de membrana pertencente à família de tetraspanina, e o Mab 214B2 anti-CD151, produzido pelo hibridoma I-3919, depositado na CNCM em 21 de fevereiro de 2008, estão descritos na publicação do pedido de patente WO 2009/136070.

[000199] Os anticorpos IgG1 murino e humano foram utilizados como anticorpos de controle de isotipo. As condições finais foram: 100.000 células/cavidade e anticorpos a 10 µg/mL. Após uma hora de incubação a 37°C, as placas foram desfolhadas e lavadas duas vezes com meio F12k sem soro. Antes da análise, 100 µL de meio F12k sem soro foram distribuídos em cada cavidade. A fim de determinar o efeito de anticorpos sobre adesão celular, as cavidades foram fotografadas sob microscópio de contraste de fase (figura 16). Em seguida, o número de células aderidas foi determinado com um ensaio para ATP (Figura 17).

[000200] Os anticorpos 214B2 murino e TH7-214B2 quimérico foram capazes de modificar interações célula-célula (Figura 16) e aumentar equivalentemente a adesão de células PC3 (Figura 17), enquanto que não foi observado efeito com a forma quimérica não modificada de 214B2 (c214B2), que foi comparável ao anticorpo IgG1 humano de controle de isotipo.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para melhorar a atividade antagonista de um anticorpo monoclonal direcionado contra uma molécula-alvo específica, ou um fragmento funcional divalente ou derivado do mesmo, o referido anticorpo ou fragmento funcional divalente do mesmo sendo capaz de inibir uma ou mais das atividades biológicas da referida molécula-alvo, sendo o referido processo caracterizado pelo fato de que compreende um estágio de reconfiguração da região de articulação consistindo em uma modificação da sequência de aminoácidos da referida região de articulação pela deleção, pela adição ou pela substituição de pelo menos um aminoácido, e

em que a referida região de articulação reconfigurada obtida por modificação de seus aminoácidos resulta em uma região de articulação tendo a sequência selecionada dentre o grupo que consiste nas sequências SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 36 e SEQ ID NO: 42 a SEQ ID NO: 49.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal é um anticorpo divalente.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal é um anticorpo quimérico.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal é um anticorpo humanizado.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal é um anticorpo humano.

6. Processo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal é um IgG1.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a referida molécula-alvo é um receptor transmembrana.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido receptor transmembrana é selecionado a partir do grupo constituído pelos receptores tirosina quinase, tetraspanina e GPCRs.

9. Processo para rastrear um anticorpo monoclonal antagonista direcionado contra uma molécula-alvo específica, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, o referido anticorpo ou fragmento funcional divalente do mesmo sendo capaz de inibir uma ou mais das atividades biológicas da referida molécula-alvo, o referido processo caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) selecionar um anticorpo inicial com um nível inicial de inibição da referida uma ou mais atividades biológicas da referida molécula-alvo;

(b) modificar a sequência de aminoácidos da região de articulação do referido anticorpo inicial pelo processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8,

(c) avaliar o anticorpo modificado da etapa (b) quanto à sua capacidade para inibir a referida uma ou mais atividades biológicas da referida molécula-alvo, e

(d) selecionar, como resultado positivo, o anticorpo da etapa (c) com um nível de inibição da referida uma ou mais atividades biológicas da referida molécula-alvo mais alto do que o nível inicial da referida inibição.

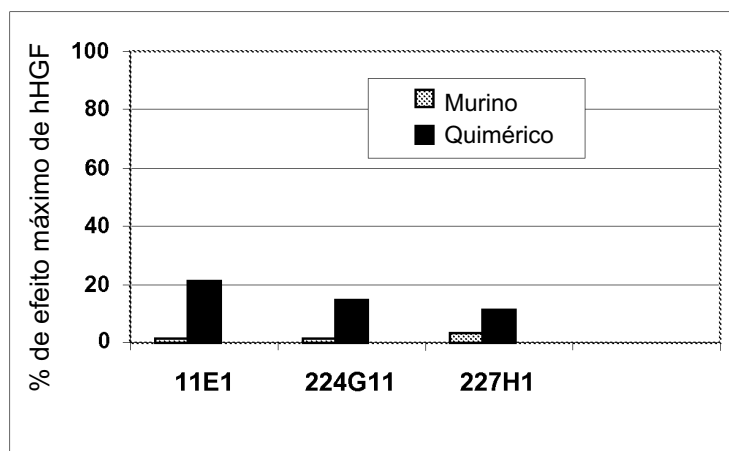


FIG. 1A

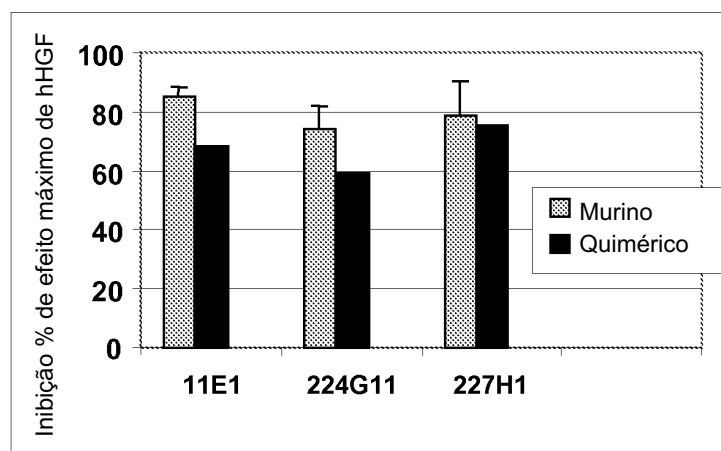


FIG. 1B

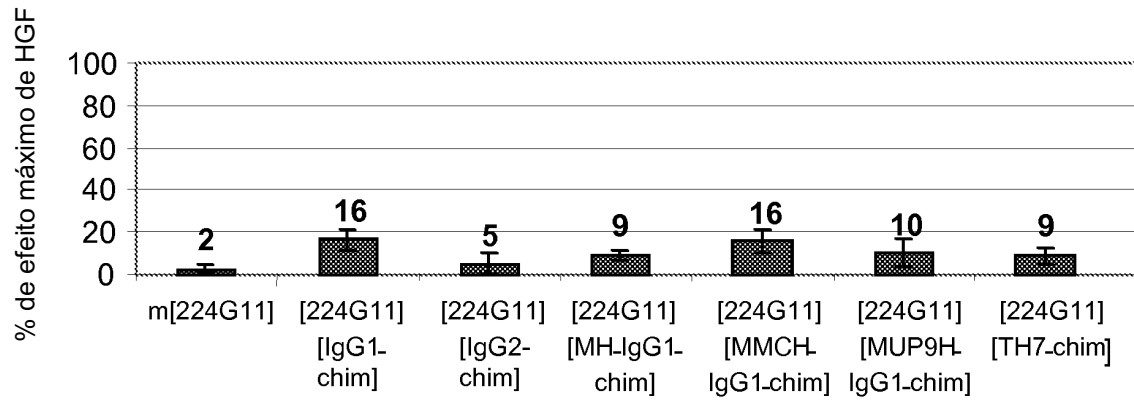


FIG. 2A

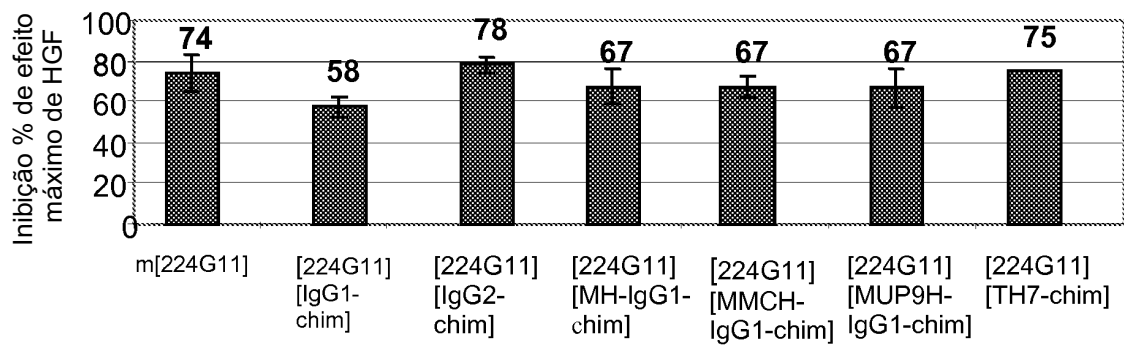


FIG. 2B

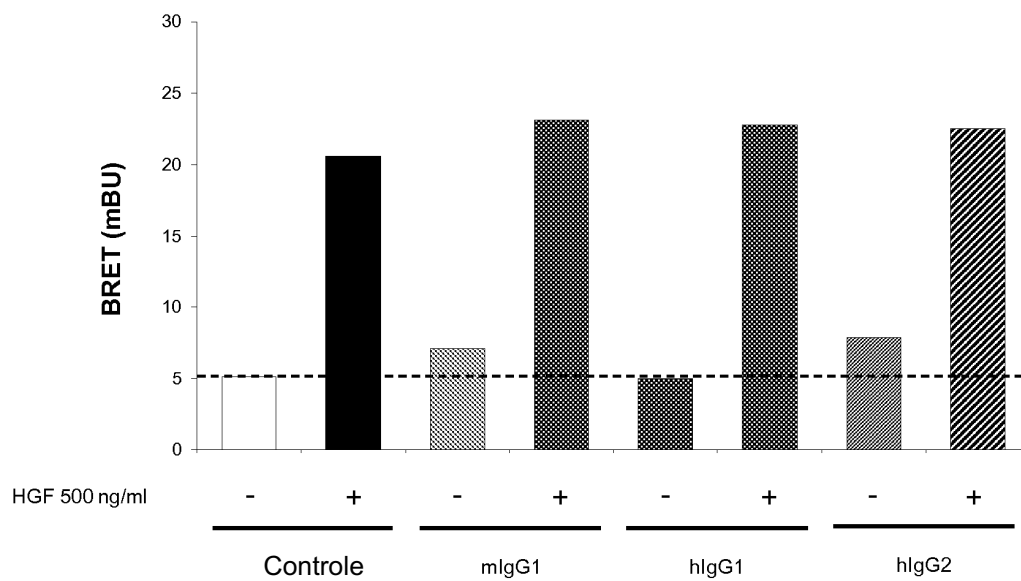


FIG. 3A

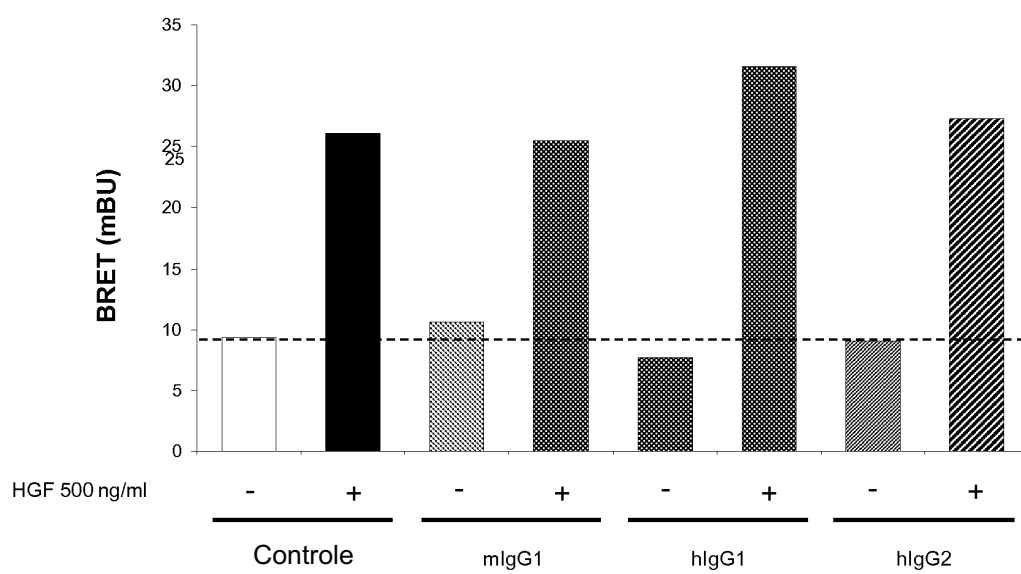


FIG. 3B

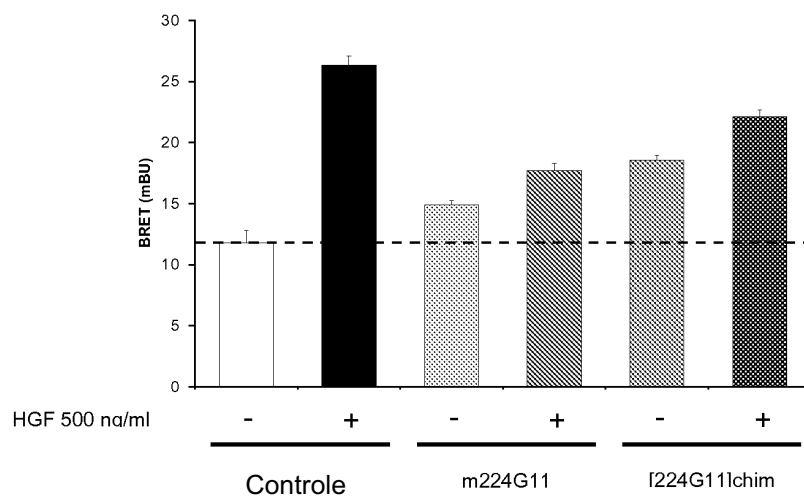


FIG. 4

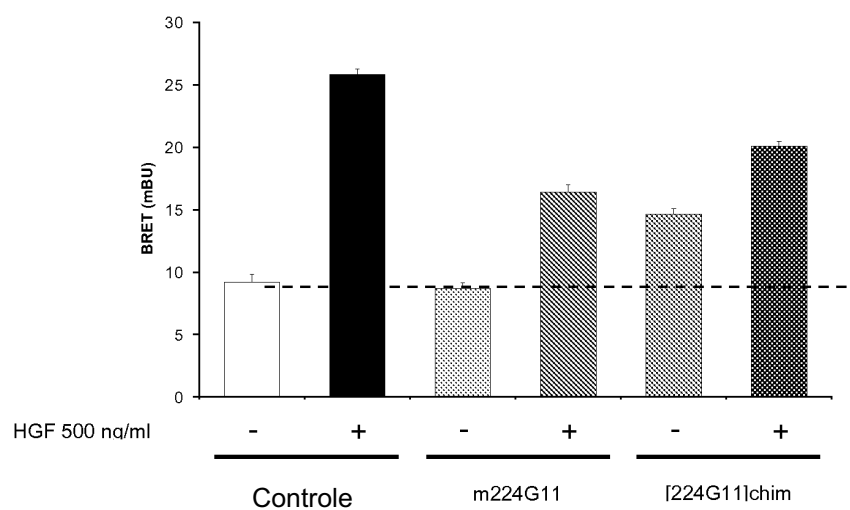


FIG. 5

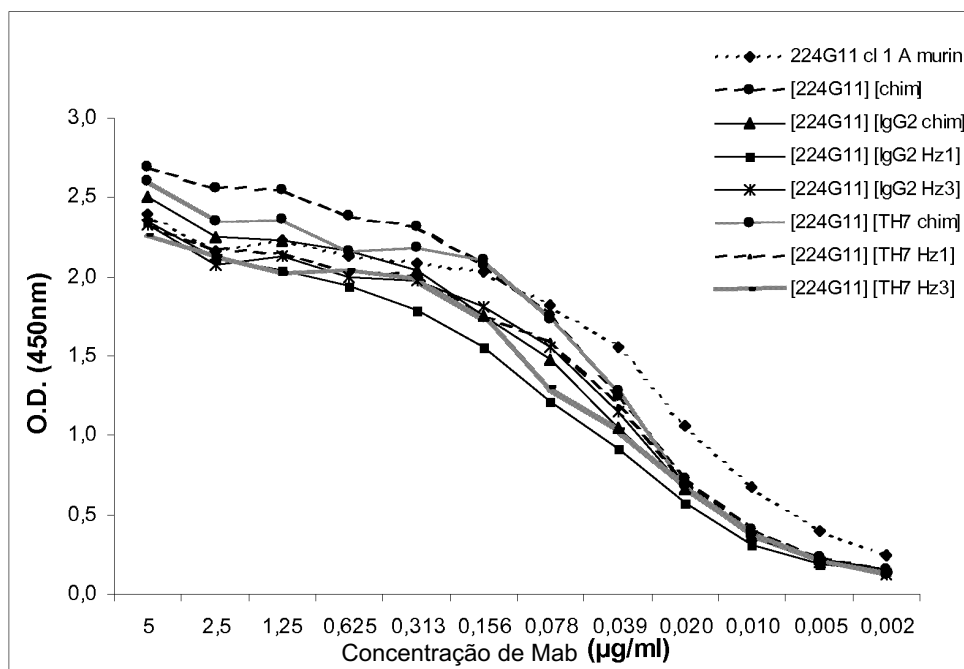


FIG. 6A

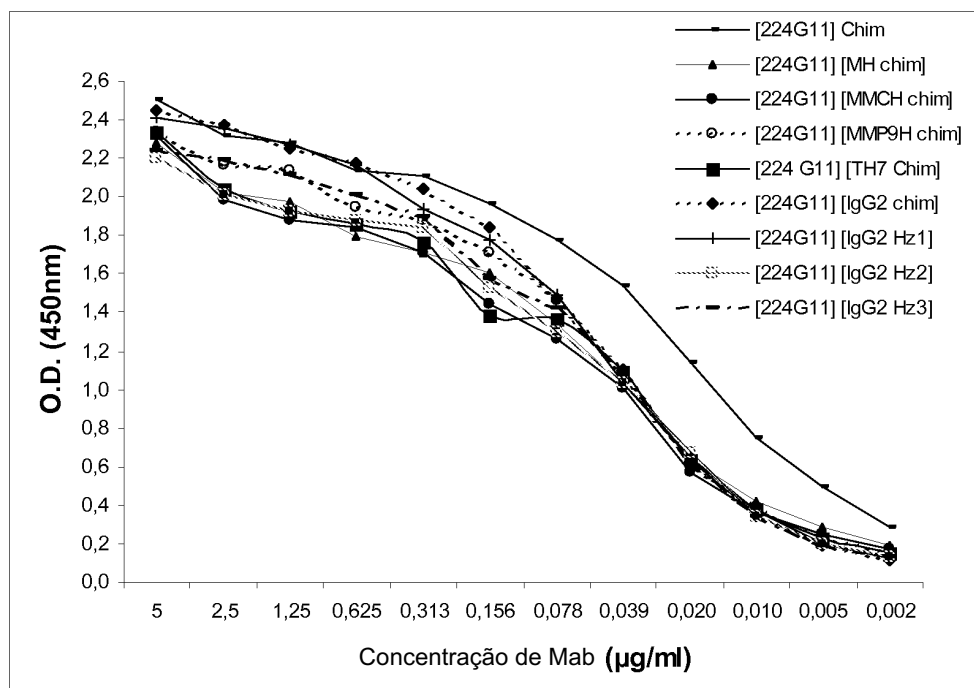


FIG. 6B

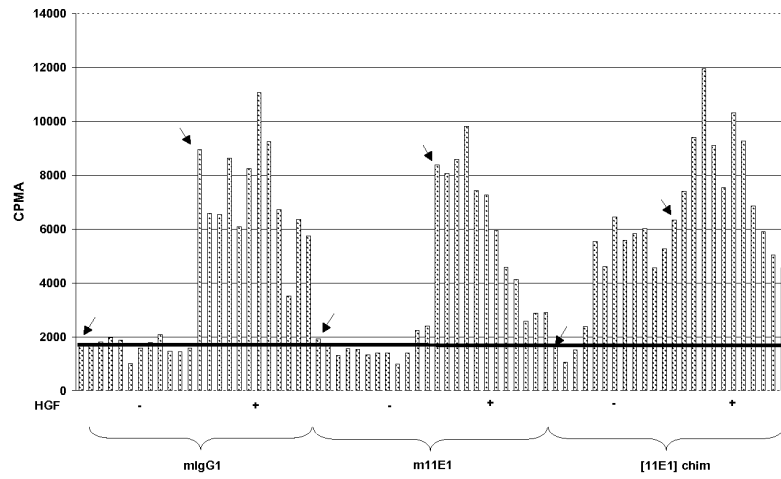


FIG. 7A

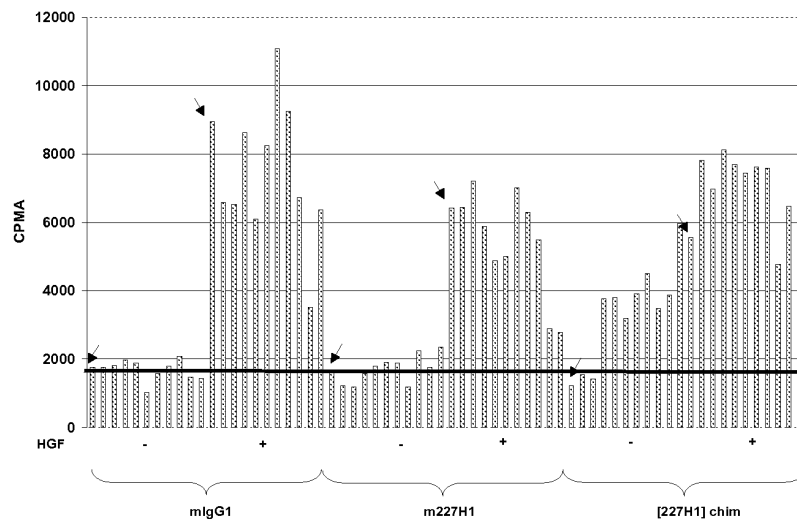


FIG. 7B

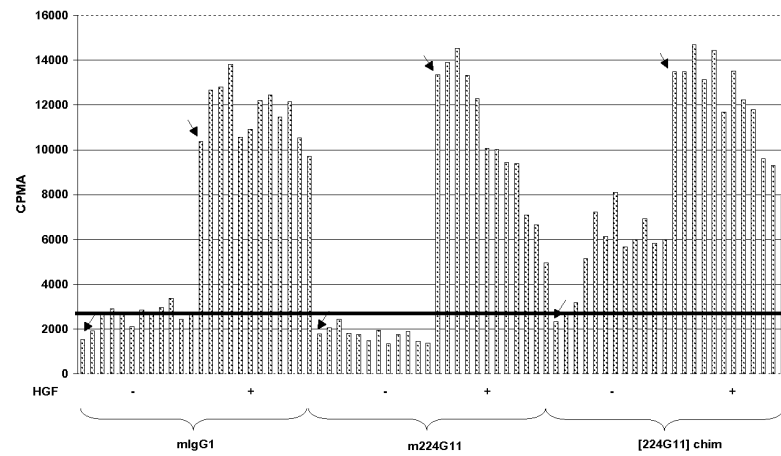


FIG. 7C

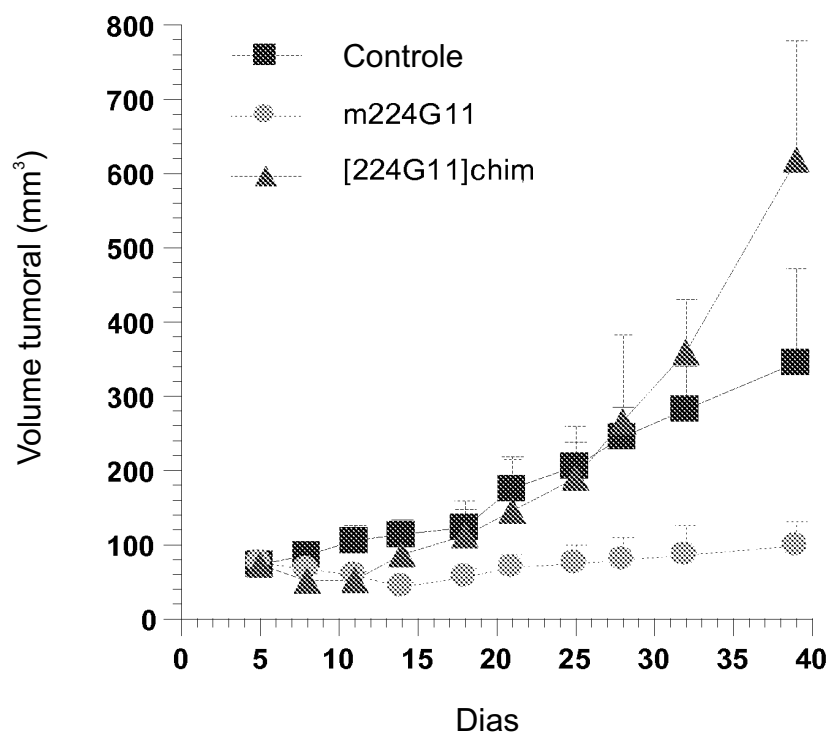


FIG. 8

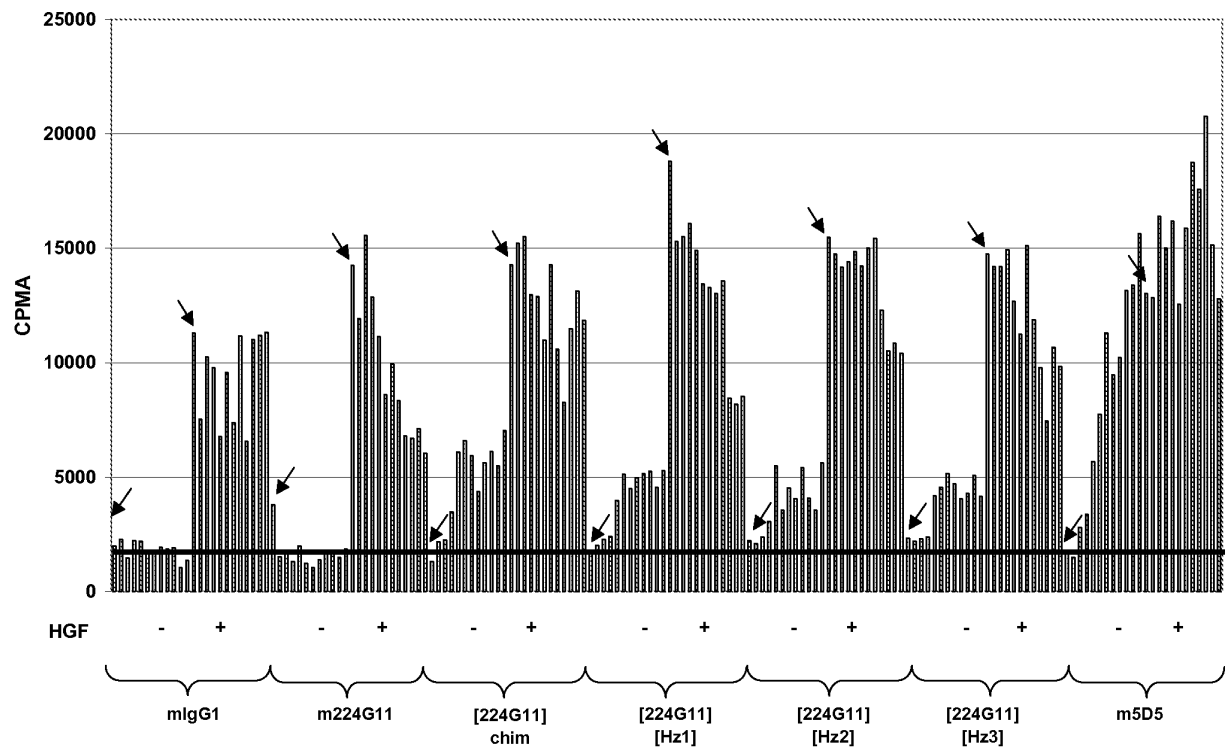


FIG. 9A

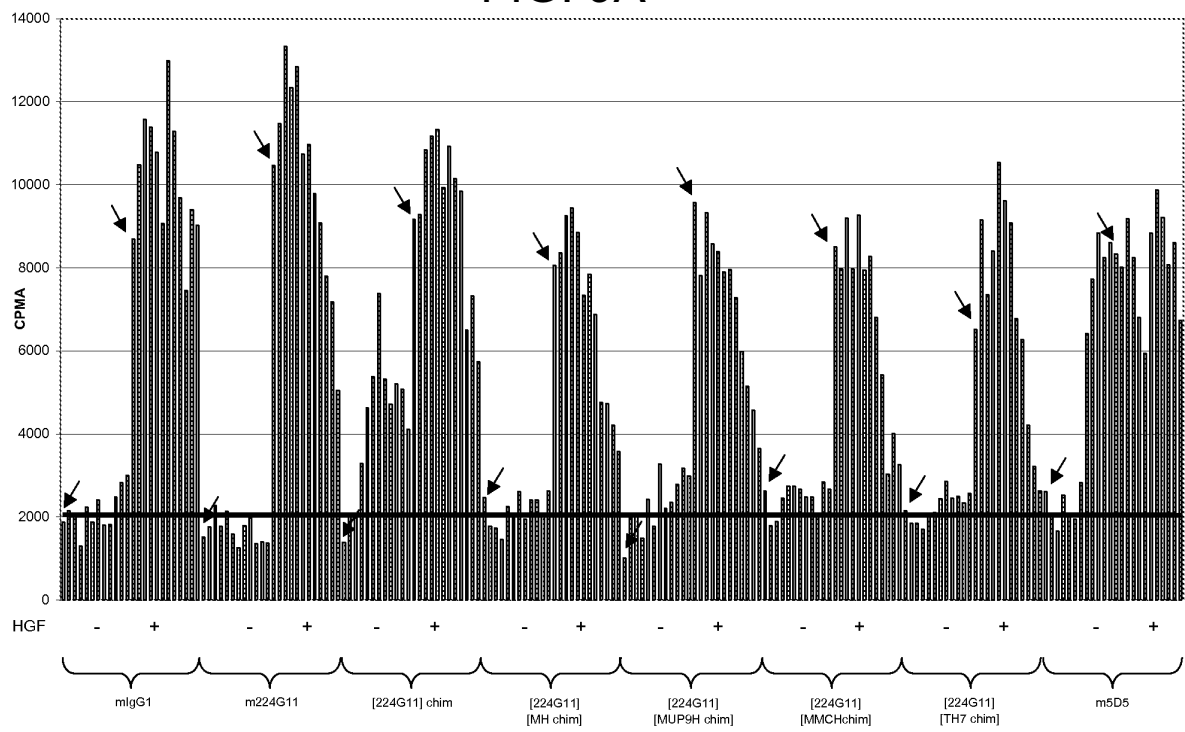


FIG. 9B

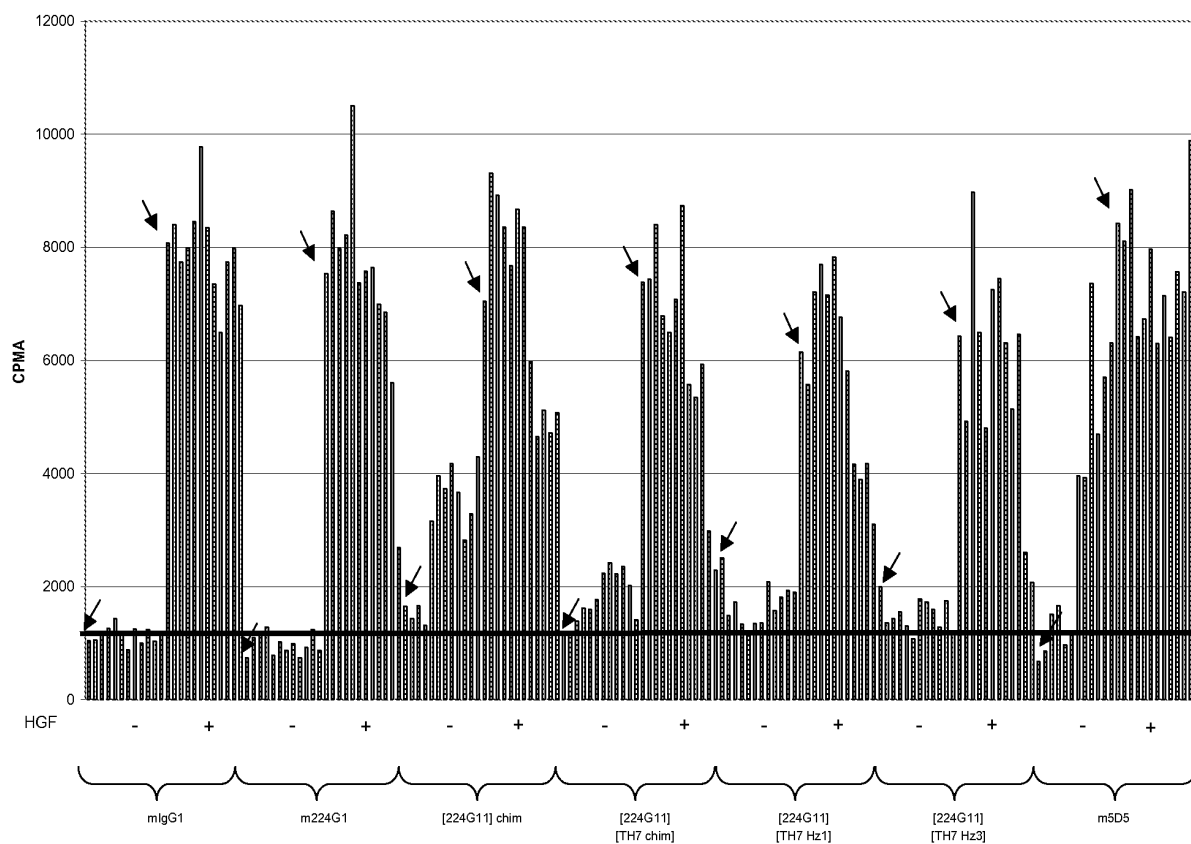


FIG. 10

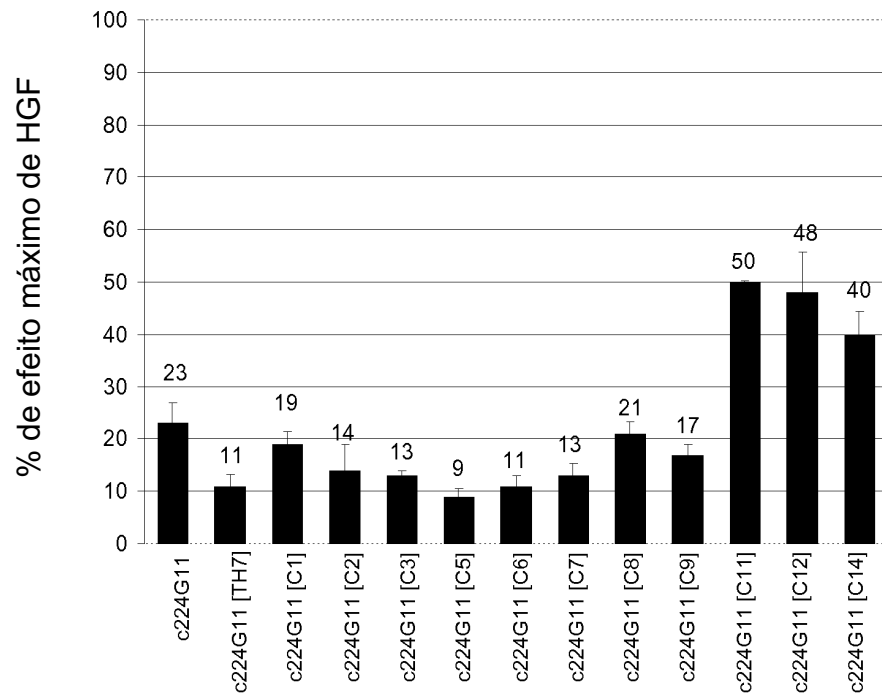


FIG. 11A

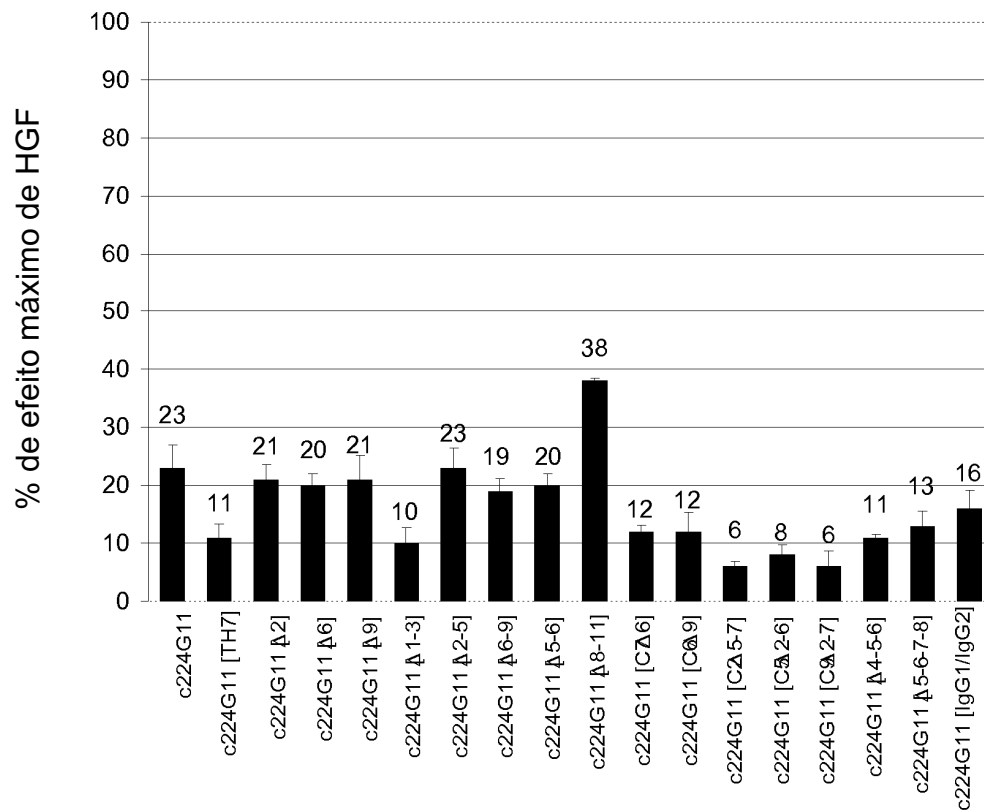


FIG. 11B

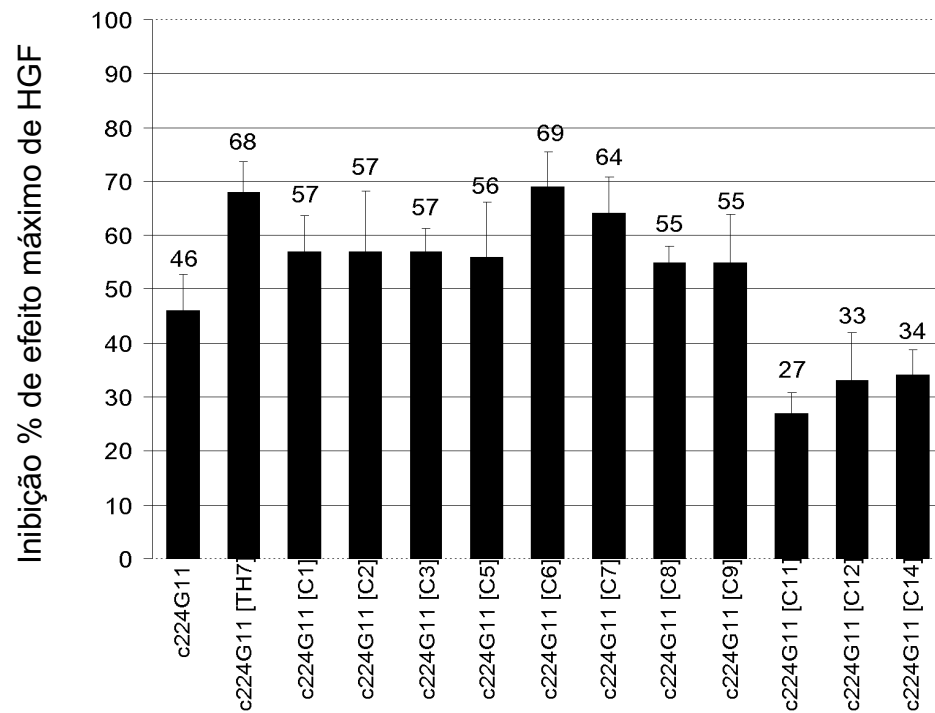


FIG. 12A

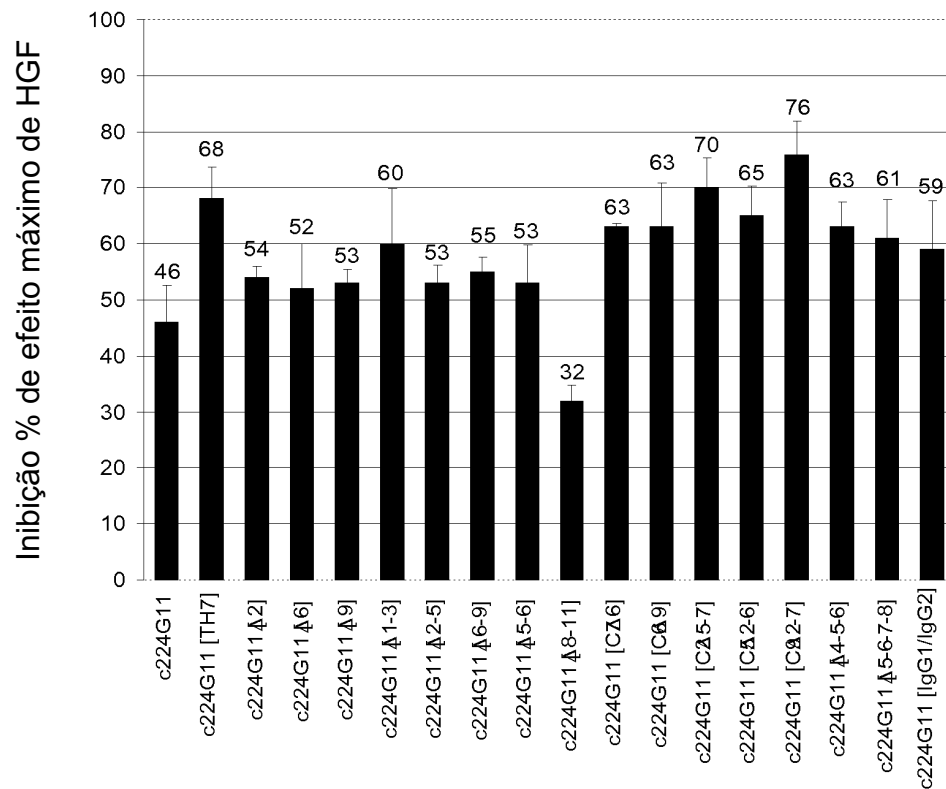


FIG. 12B

12/15

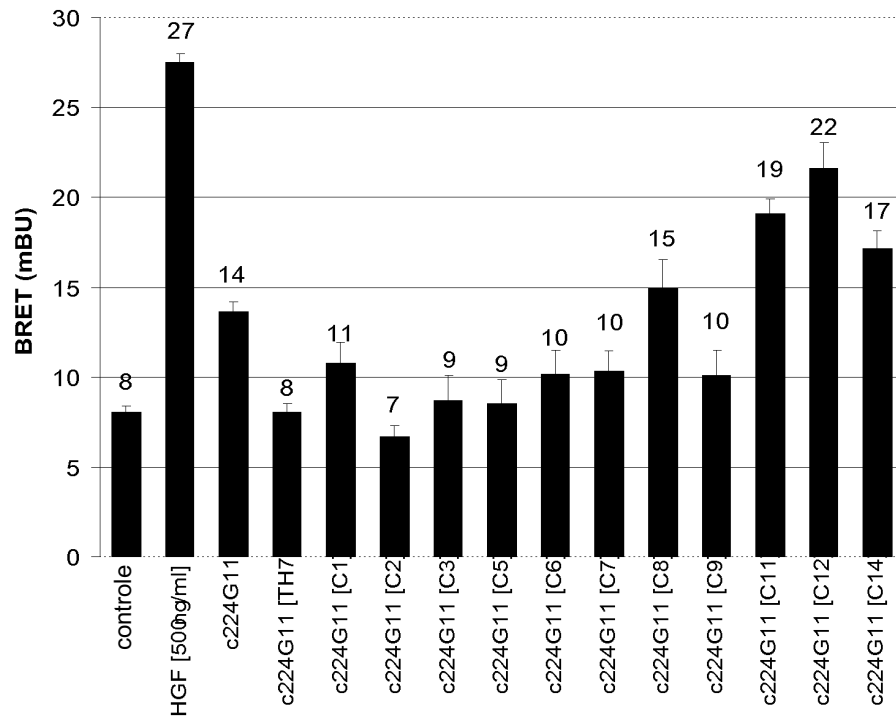


FIG. 13A

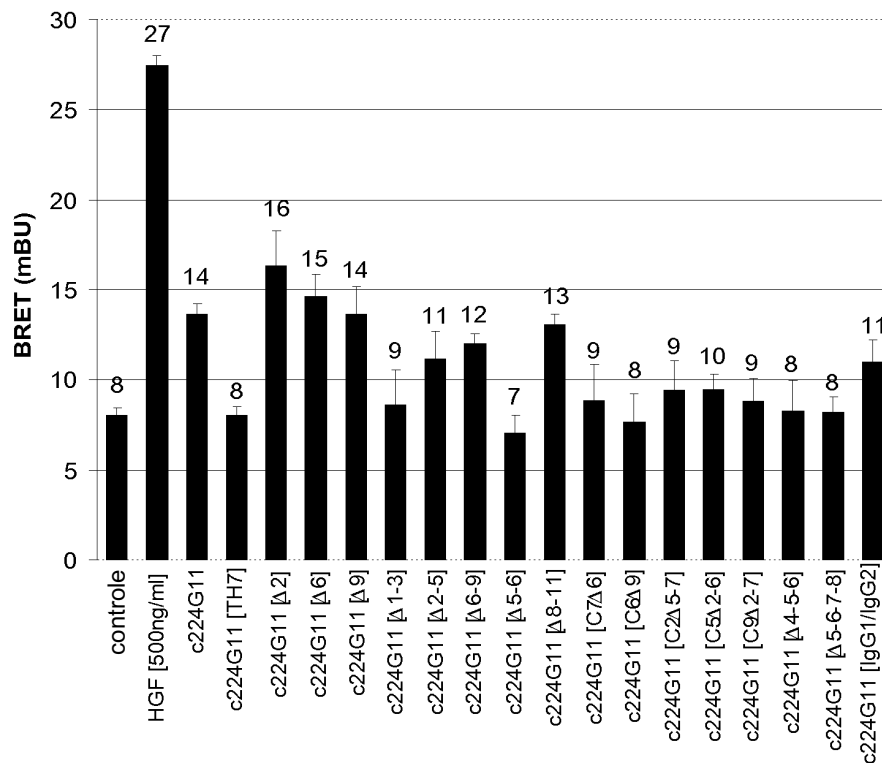


FIG. 13B

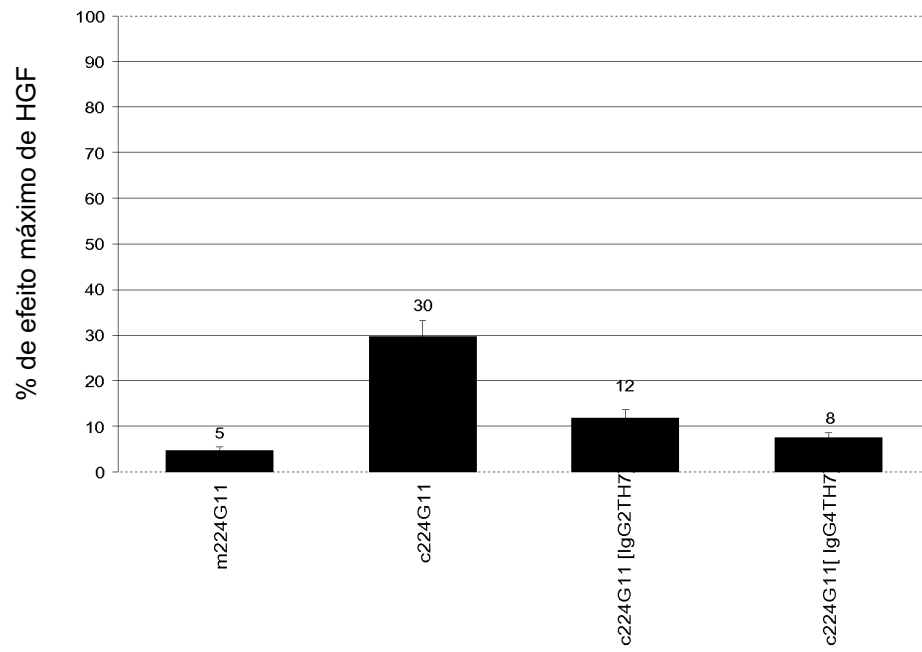


FIG. 14A

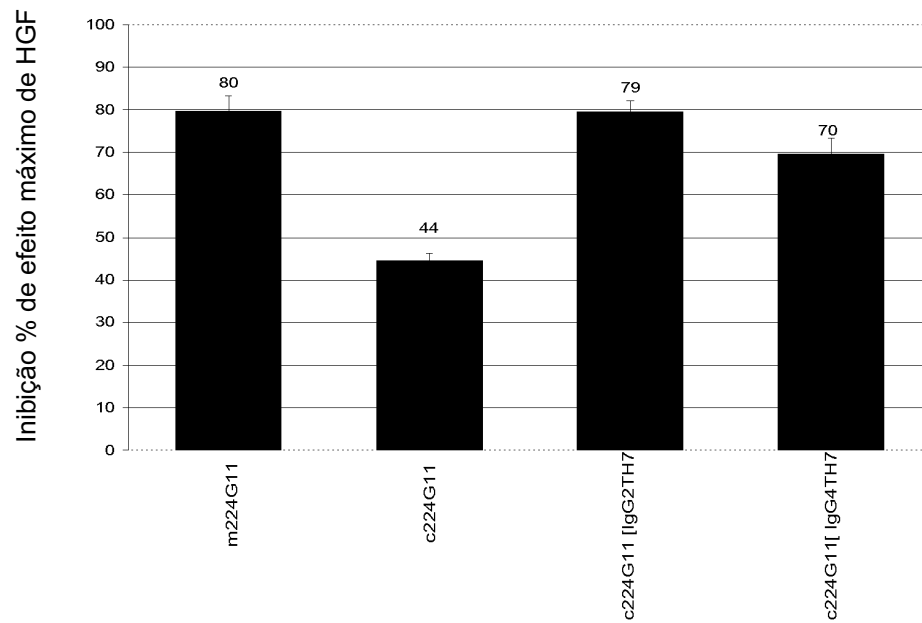


FIG. 14B

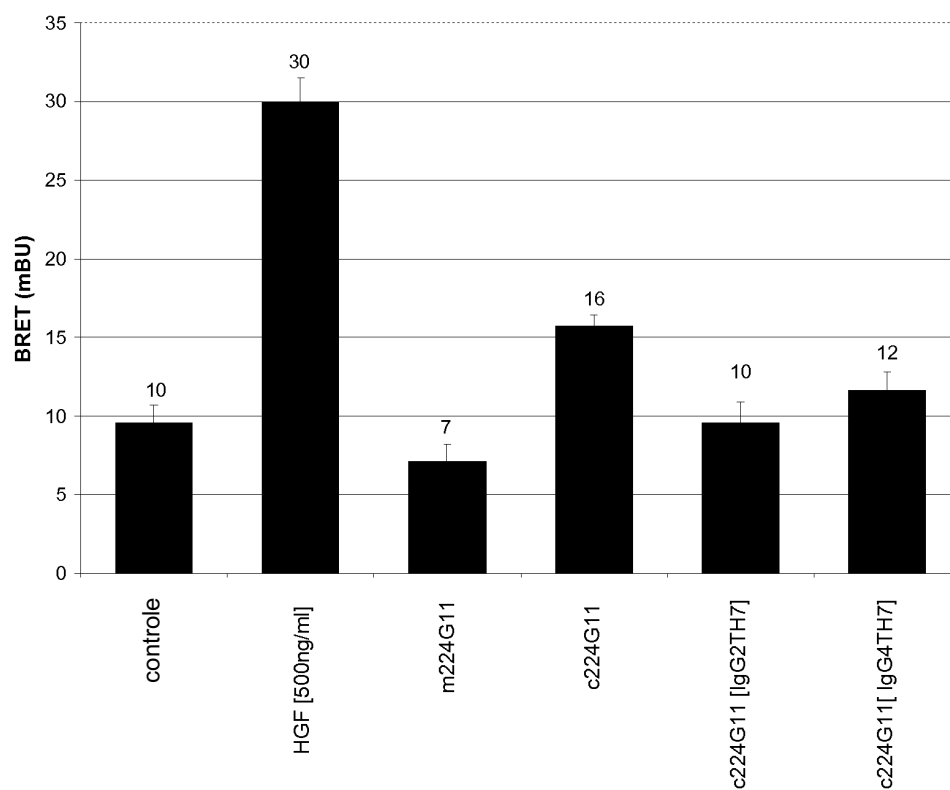


FIG. 15

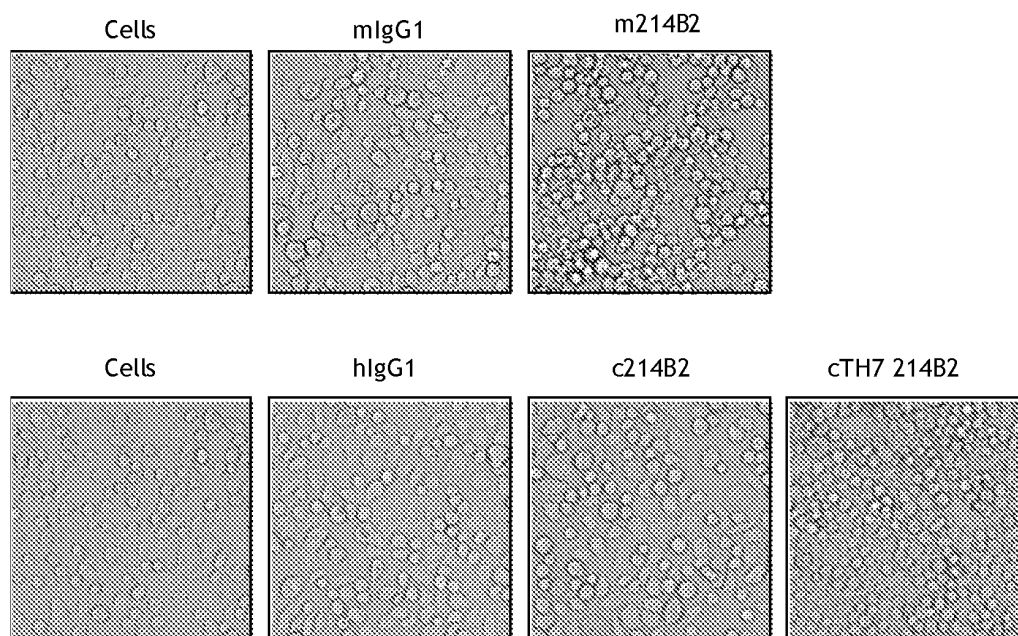


FIG. 16

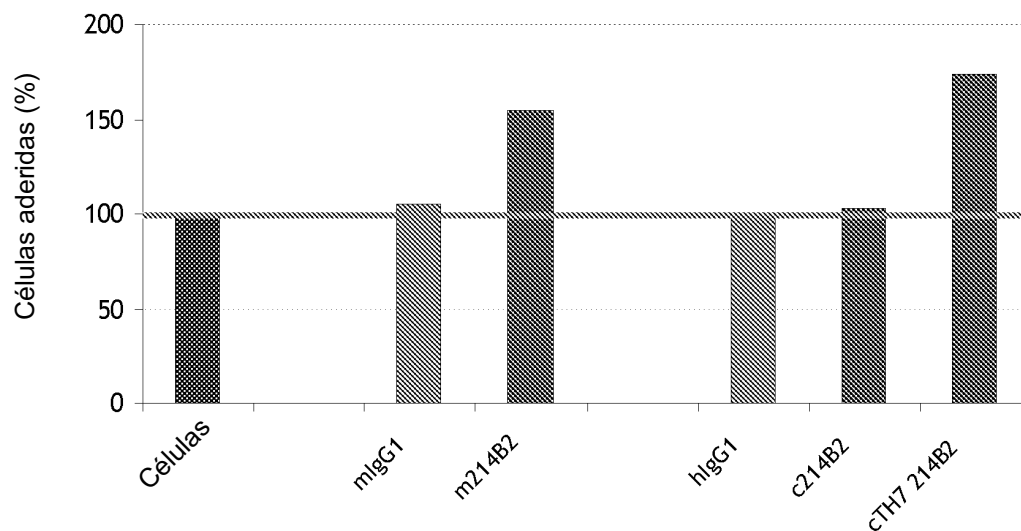


FIG. 17