

(11) Número de Publicação: **PT 2163256 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/395 (2015.01) **A61P 35/00** (2015.01)
C07K 16/28 (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.05.13**

(30) Prioridade(s): **2001.05.11 US 290410 P**
2001.09.28 US 326019 P
2001.12.21 US 342258 P

(43) Data de publicação do pedido: **2010.03.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.09.02**
228/2015

(73) Titular(es):
LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD.
605 THIRD AVENUE NEW YORK, NY 10158 US

(72) Inventor(es):
LLOYD J. OLD US
TERRANCE GRANT JOHNS AU
ANDREW MARK SCOTT AU
GERD RITTER US
ACHIM JUNGBLUTH US

(74) Mandatário:
FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º 1200-195 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA E SUAS UTILIZAÇÕES

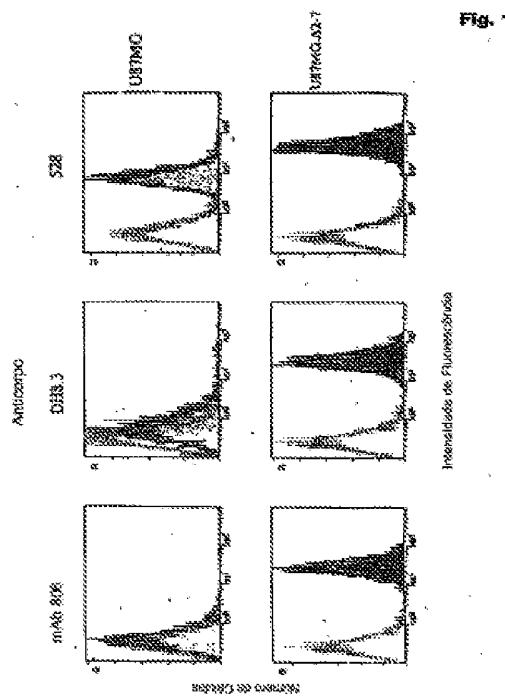
(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO REFERE-SE A MEMBROS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA, PARTICULARMENTE ANTICORPOS E SEUS FRAGMENTOS ATIVOS, QUE RECONHECEM UMA FORMA DO EGFR ABERRANTE MODIFICADA PÓS-TRADUÇÃO, PARTICULARMENTE UMA FORMA ABERRANTE GLICOSILADA. OS MEMBROS DE LIGAÇÃO, PARTICULARMENTE ANTICORPOS E SEUS FRAGMENTOS, DO PRESENTE INVENTO NÃO SE LIGAM A EGFR EM CÉLULAS NORMAIS NA AUSÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE TIPO SELVAGEM E SÃO CAPAZES DE SE LIGAR AO EGFR DE2-7 NUM EPÍTOPO QUE É DISTINTO DO PÉPTIDO DE JUNÇÃO. OS ANTICORPOS DESTE TIPO SÃO EXEMPLIFICADOS PELO NOVO ANTICORPO 806 CUJAS SEQUÊNCIAS DE VH E VL SÃO ILUSTRADAS COMO SEQ ID NO:2 E 4 E SEUS ANTICORPOS QUIMÉRICOS TAL COMO EXEMPLIFICADO POR CH806.

RESUMO

"Proteínas de ligação específica e suas utilizações"

O presente invento refere-se a membros de ligação específica, particularmente anticorpos e seus fragmentos ativos, que reconhecem uma forma do EGFR aberrante modificada pós-tradução, particularmente uma forma aberrante glicosilada. Os membros de ligação, particularmente anticorpos e seus fragmentos, do presente invento não se ligam a EGFR em células normais na ausência de amplificação do gene de tipo selvagem e são capazes de se ligar ao EGFR de 2-7 num epítopo que é distinto do péptido de junção. Os anticorpos deste tipo são exemplificados pelo novo anticorpo 806 cujas sequências de VH e VL são ilustradas como SEQ ID NO:2 e 4 e seus anticorpos quiméricos tal como exemplificado por ch806.



DESCRIÇÃO

"Proteínas de ligação específica e suas utilizações"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se a membros de ligação específica, particularmente anticorpos e seus fragmentos, que se ligam ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) amplificado e à truncagem EGFR de2-7 do EGFR. Em particular, o epítopo reconhecido pelos membros de ligação específica, particularmente anticorpos e seus fragmentos, é aumentado ou evidenciado após modificação aberrante pós-tradução. Estes membros de ligação específica são úteis no diagnóstico e tratamento de cancro. Os membros de ligação do presente invento podem também ser utilizados em terapia em combinação com quimioterapêuticos ou agentes anticancerosos e/ou com outros anticorpos ou seus fragmentos.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O tratamento de doença proliferativa, particularmente cancro, através de meios quimioterapêuticos assenta frequentemente na exploração das diferenças nas células em proliferação alvo e outras células normais no corpo humano ou animal. Por exemplo, muitos agentes químicos são concebidos para serem tomados por ADN em rápida replicação de modo a que o processo de replicação do ADN e de divisão celular seja interrompido. Outra abordagem é identificar antigénios à superfície de células tumorais ou outras células anormais que não sejam normalmente expressos em tecido humano desenvolvido, tais como antigénios tumorais ou antigénios embrionários. Tais antigénios podem ser apontados com proteínas de ligação tais como anticorpos que podem bloquear ou neutralizar o antigénio. Adicionalmente, as proteínas de ligação, incluindo anticorpos e seus fragmentos, podem distribuir um agente tóxico ou outra substância que seja capaz de ativar diretamente ou indiretamente um agente tóxico no local de um tumor.

O EGFR é um alvo atrativo para terapia de anticorpos direcionada a tumores porque é sobre-expresso em muitos tipos

de tumores epiteliais (27,28). Para além disso, a expressão do EGFR está associada a um fraco prognóstico em vários tipos de tumores incluindo estômago, cólon, bexiga, mama, próstata, endométrio, rim e cérebro (p.ex., glioma). Consequentemente, vários anticorpos de EGFR foram relatados na literatura com vários sujeitos a avaliação clínica (18,19,29). Os resultados de estudos utilizando mAb de EGFR em pacientes com cancro da cabeça e pescoço, cancro pulmonar de células escamosas, gliomas cerebrais e astrocitomas malignos foram encorajadores. A atividade antitumoral da maioria dos anticorpos de EGFR é aumentada através da sua capacidade para bloquear a ligação ao ligando (30,31). Tais anticorpos podem mediar a sua eficácia através de modulação da proliferação celular e de funções imunitárias dependentes de anticorpos (p.ex., ativação do complemento). A utilização destes anticorpos, no entanto, pode estar limitada pela tomada por órgãos que tenham níveis endógenos elevados de EGFR tais como o fígado e a pele (18,19).

Uma proporção significativa de tumores contendo amplificações do gene de EGFR (i.e., múltiplas cópias do gene de EGFR) também co-expressa uma versão truncada do recetor (13) conhecido como EGFR de2-7, EGFR ou 2-7 (termos aqui utilizados indiferentemente) (2). O rearranjo observado no EGFR de2-7 resulta num ARNm maduro enquadrado sem 801 nucleótidos abrangendo os exões 2-7 (6-9). A proteína EGFR correspondente tem uma deleção de 267 aminoácidos compreendendo os resíduos 6-273 do domínio extracelular e um novo resíduo de glicina na junção da fusão (9). Esta deleção, juntamente com a inserção de um resíduo de glicina, produz um péptido de junção único na interface da deleção (9). O EGFR de2-7 (2) foi relatado em vários tipos de tumores incluindo glioma, mama, pulmão, ovário e próstata (1-4). Embora este recetor truncado não se ligue ao ligando, possui baixa atividade constitutiva e confere uma significativa vantagem de crescimento às células de glioma criadas como xenoenxertos de tumor em ratinhos nus (10) e é capaz de transformar células NIH3T3 (11) e células MCF-7. Os mecanismos celulares utilizados pelo EGFR de2-7 em células de glioma não estão completamente definidos mas está relatado que incluem uma diminuição na apoptose (12) e um pequeno aumento da proliferação (12).

Como a expressão deste recetor truncado está restringida às células tumorais, representa um alvo altamente específico para terapia de anticorpos. Assim, vários laboratórios relataram a geração de anticorpos policlonais (14) e monoclonais (3,15,16) específicos para o péptido único de EGFR de2-7. Uma série de mAb de ratinho, isolada após imunização com o péptido de2-7 único, mostrou toda seletividade e especificidade para o recetor truncado e dirigiu-se a xenoenxertos positivos para EGFR de2-7 criados em ratinhos nus (3,25,32).

No entanto, um potencial defeito dos anticorpos de EGFR de2-7 é que apenas uma proporção dos tumores exibindo amplificação do gene de EGFR expressa também o EGFR 2-7 (5). A percentagem exata de tumores contendo o EGFR de2-7 não está completamente estabelecida, porque a utilização de diferentes técnicas (i.e. PCR versus imuno-histoquímica) e vários anticorpos, produziu uma ampla variedade de valores relatados para a frequência da sua presença. Os dados publicados indicam que aproximadamente 25-30% dos gliomas expressam EGFR de2-7 sendo a expressão menor em astrocitomas anaplásicos e mais elevada em glioblastoma multiforme (6,13,17). A proporção de células positivas dentro dos gliomas que expressam EGFR de2-7 foi relatada como variando de 37-86% (1). Verificou-se que 27% dos carcinomas da mama e 17% dos cancros do pulmão eram positivos para o EGFR de2-7 (1,3,13,16). Assim, espera-se que anticorpos específicos de EGFR de2-7 sejam úteis apenas numa percentagem dos tumores positivos para EGFR.

Assim, embora a prova existente de atividade de anticorpos de EGFR seja encorajadora, permanecem as limitações observadas no intervalo da aplicabilidade e eficácia refletidas acima. Assim, seria desejável desenvolver anticorpos e agentes semelhantes que demonstrem eficácia com uma ampla variedade de tumores, e é para alcançar esse objetivo que o presente invento está dirigido.

A citação das referências aqui não deverá ser entendida como uma admissão de que tais são arte anterior ao presente invento.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona um anticorpo isolado ou seu fragmento ativo, em que o referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo: (a) liga-se ao EGFR humano de tipo selvagem ligado às células quando o gene de EGFR é amplificado; (b) liga-se a EGFR de2-7 num epítopo distinto do péptido de junção LEEKKGNVYVTDH; (c) não se liga a células de tipo selvagem que expressam EGFR endógeno; e (d) reconhece um epítopo dentro da sequência de resíduos 273-501 do EGFR humano de tipo selvagem.

Aspetos e concretizações adicionais do invento estão estabelecidos nas reivindicações apensas.

O presente invento proporciona um membro de ligação específico isolado, particularmente um anticorpo ou seu fragmento, que reconhece um epítopo de EGFR que não demonstra quaisquer alterações ou substituições na sequência de aminoácidos em relação ao EGFR de tipo selvagem e que é encontrado em células tumorigénicas, hiperproliferativas ou anormais e não é detetável em células normais ou de tipo selvagem (a expressão "célula de tipo selvagem" tal como aqui se utiliza contempla uma célula que expressa EGFR endógeno mas não o EGFR de2-7 e a expressão exclui especificamente uma célula que sobre-expresse o gene de EGFR; a expressão "tipo selvagem" refere-se a um genótipo ou fenótipo ou outra característica presente numa célula normal em vez de numa célula anormal ou tumorigénica).

O presente invento proporciona um membro de ligação específica, particularmente um anticorpo ou seu fragmento, que reconhece um epítopo de EGFR que é encontrado em células tumorigénicas, hiperproliferativas ou anormais e não é detetável em células normais ou de tipo selvagem, em que o epítopo é aumentado ou evidente após modificação aberrante pós-tradução ou expressão aberrante. Numa exemplificação particular não limitante aqui proporcionada, o epítopo de EGFR é aumentando ou evidente sendo que a modificação pós-tradução não é completa ou inteira até ao ponto observado com expressão normal do EGFR em células de tipo selvagem. Num aspeto, o epítopo de EGFR é aumentado ou evidente após modificação

inicial ou simples dos hidratos de carbono ou glicosilação inicial, particularmente uma modificação de rica em manose, e é reduzido ou não evidente na presença de uma modificação complexa dos hidratos de carbono.

O membro de ligação específica, que é um anticorpo ou um seu fragmento, tal como um seu fragmento imunogénico, não se liga ou reconhece células normais ou de tipo selvagem contendo o epítopo de EGFR normal ou de tipo selvagem na ausência de expressão aberrante e na presença de modificação normal pós-tradução do EGFR. Mais particularmente, o membro de ligação específica do presente invento, que é um anticorpo ou seu fragmento, reconhece um epítopo de EGFR que está presente em células que sobre-expressam EGFR (p.ex., o gene de EGFR está amplificado) ou que expressam o EGFR de2-7, particularmente na presença de modificação pós-tradução aberrante, e que não é detetável em células que expressam EGFR sob condições normais, particularmente na presença de modificação pós-tradução normal.

Os presentes inventores determinaram novos anticorpos monoclonais, aqui exemplificados pelo anticorpo designado mAb 806, que reconhecem especificamente EGFR expresso de forma aberrante. Em particular, os anticorpos do presente invento reconhecem um epítopo de EGFR que é encontrado em células tumorigénicas, hiperproliferativas ou anormais e não é detetável em células normais ou de tipo selvagem, em que o epítopo é aumentado ou evidente após modificação pós-tradução aberrante. Os anticorpos do presente invento são ainda exemplificados pelos anticorpos mAb 124 e mAb 1133 aqui descritos. Os novos anticorpos do presente invento também reconhecem EGFR de tipo selvagem amplificado e o EGFR de2-7, contudo ligam-se a um epítopo distinto do péptido de junção único da mutação EGFR de2-7. Os anticorpos do presente invento reconhecem especificamente EGFR expresso de forma aberrante, incluindo EGFR amplificado e EGFR mutante (aqui exemplificado pela mutação de2-7), particularmente após modificação pós-tradução aberrante. Adicionalmente, embora o mAb 806 não reconheça o EGFR quando expresso na superfície celular de uma linha celular de glioma que expressa quantidades normais de EGFR, este liga-se ao domínio extracelular do EGFR (sEGFR) imobilizado à superfície de placas de ELISA, indicando o

reconhecimento de um epítopo conformacional. O mAb 806 liga-se à superfície de células A431, que possuem uma amplificação do gene de EGFR mas não expressam o EGFR de2-7. Importantemente, o mAb 806 não se ligou significativamente a tecidos normais tais como fígado e pele, que expressam níveis de EGFR de tipo selvagem (wt) endógeno que são mais elevados que na maioria dos outros tecidos normais, mas em que EGFR não é expresso de forma aberrante nem amplificado.

Os anticorpos do presente invento podem categorizar especificamente a natureza dos tumores ou das células tumorigénicas com EGFR, através de coloração ou de reconhecimento por outro modo dos tumores ou células em que está presente expressão aberrante de EGFR, incluindo amplificação de EGFR e/ou mutação de EGFR, particularmente EGFR de2-7. Mais, os anticorpos do presente invento, tal como exemplificados pelo mAb 806, demonstram uma significativa atividade antitumoral *in vivo* contra tumores contendo EGFR amplificado e contra xenoenxertos positivos para EGFR de2-7.

A especificidade única do mAb 806, pela qual o mAb 806 se liga ao EGFR de2-7 e ao EGFR amplificado mas não ao EGFR de tipo selvagem normal, proporciona utilizações de diagnóstico e terapêuticas para identificar, caracterizar e alvejar vários tipos de tumores, por exemplo, tumores da cabeça e do pescoço, da mama ou próstata e glioma, sem os problemas associados com a tomada por tecidos normais que pode ser observada com os anticorpos de EGFR anteriormente conhecidos.

Assim, o presente invento proporciona proteínas de ligação específica, tais como anticorpos, que se ligam ao EGFR de2-7 num epítopo que é distinto do péptido de junção mas que não se liga ao EGFR em células normais na ausência de amplificação do gene de EGFR. Por amplificação, pretende-se incluir que a célula comprehende múltiplas cópias do gene de EGFR.

O epítopo reconhecido pelo mAb 806 situa-se dentro da região compreendendo os resíduos 273-501 da sequência de EGFR maduro normal ou de tipo selvagem. Por essa razão, são também proporcionadas proteínas de ligação específica, tais como anticorpos, que se ligam ao EGFR de2-7 num epítopo situado

dentro da região compreendendo os resíduos 273-501 da sequência de EGFR. O epítopo pode ser determinado através de quaisquer técnicas de mapeamento de epítopos convencionais conhecidas dos peritos na especialidade. Alternativamente, a sequência de ADN codificando os resíduos 273-501 pode ser digerida, e os fragmentos resultantes expressos num hospedeiro adequado. A ligação do anticorpo pode ser determinada tal como mencionado acima.

Num aspeto preferido, o anticorpo é um que tem as características do anticorpo que os inventores identificaram e caracterizaram, em particular, o reconhecimento de EGFR expresso de forma aberrante, como se verifica no EGFR amplificado e no EGFR de2-7. Num aspeto particularmente preferido o anticorpo é o mAb 806 ou seus fragmentos ativos. Noutro aspeto preferido o anticorpo do presente invento comprehende as sequências de aminoácidos de VH e VL representadas nas Figuras 14 (SEQ ID NO:2) e Figuras 15 (SEQ ID NO:4), respetivamente.

Noutro aspeto, o presente invento proporciona um anticorpo capaz de competir com o anticorpo 806, sob condições nas quais pelo menos 10% de um anticorpo possuindo as sequências de VH e VL do anticorpo 806 são bloqueados para se ligarem a EGFR de2-7 através de competição com um tal anticorpo num ensaio ELISA. Em particular, anticorpos anti-idiotípicos estão contemplados e são aqui exemplificados. Os anticorpos anti-idiotípicos LMH-11, LMH-12 e LMH-13 são aqui proporcionados.

Um polipeptídeo isolado consistindo essencialmente no epítopo compreendendo os resíduos 273-501 do EGFR de tipo selvagem, maduro normal (resíduos 6-234 do EGFR de2-7 maduro) forma outro aspeto da presente divulgação. O péptido é particularmente útil em ensaios de diagnóstico ou estojos e terapeuticamente ou profilaticamente, incluindo como vacina antitumoral ou anticancerosa. Assim, composições do péptido incluem composições farmacêuticas e composições imunogénicas.

A ligação de um anticorpo ao seu抗ígeno alvo é mediada através das regiões determinantes de complementaridade (CDR) das suas cadeias pesada e leve, sendo o papel de CDR3 de

particular importância. Assim, os membros de ligação específica baseados nas regiões CDR3 da cadeia pesada ou leve, e de preferência ambas, de mAb 806 serão membros de ligação específica úteis para terapia *in vivo*. As CDR do anticorpo mAb 806 são mostradas nas Figuras 16 e 17.

Assim, as proteínas de ligação específica tais como anticorpos que são baseadas nas CDR do anticorpo mAb806 identificadas, particularmente as regiões CDR3, serão úteis para atingir tumores com EGFR amplificado independentemente do seu *status* de EGFR de2-7. Uma vez que o mAb 806 não se liga significativamente ao recetor normal de tipo selvagem, não haveria tomada significativa em tecidos normais, uma limitação dos anticorpos de EGFR atualmente em desenvolvimento (18, 19).

Nos desenhos anexos, a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:1) e a tradução (SEQ ID NO:2) desta do gene de VH de 806 é mostrada na Figura 14. O gene de VL do anticorpo 806 é mostrado como Figura 15 como sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:3) e sequência de aminoácidos prevista (SEQ ID NO:4). Nas Figuras 16 e 17, representando as sequências polipeptídicas de VH e VL do mAb 806, as CDR estão indicadas em caixas.

Noutro aspeto, o presente invento proporciona um membro de ligação específica isolado capaz de se ligar a um antigénio, em que o referido membro de ligação específica comprehende um domínio de ligação polipeptídico comprehendendo uma sequência de aminoácidos substancialmente tal como exposta como resíduos 115-123 de SEQ ID NO:2. O presente invento proporciona ainda o referido membro de ligação específica isolado que comprehende ainda um ou ambos os domínios de ligação polipeptídicos substancialmente tal como expostos como resíduos 44-54 e 68-83 de SEQ ID NO:2, de preferência ambos. Um exemplo de uma tal concretização é a sequência substancialmente tal como mostrada em SEQ ID NO:2. Numa concretização preferida, os domínios de ligação são suportados por uma estrutura de anticorpo humano.

Noutro aspeto, o presente invento proporciona um membro de ligação específica isolado capaz de se ligar a um antigénio tumoral, em que o referido membro de ligação específica

compreende um domínio de ligação polipeptídico compreendendo uma sequência da cadeia pesada compreendendo pelo menos a sequência de CDR3 de SEQ ID NO:2, juntamente com uma cadeia leve compreendendo CDR cujas sequências de aminoácidos são substancialmente como se encontram em SEQ ID NO:4. Um exemplo de uma tal concretização é a sequência substancialmente tal como mostrada em SEQ ID NO:4. Numa concretização preferida, as CDR são suportadas por uma estrutura de anticorpo humano.

Noutros aspetos, o presente invento proporciona um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência codificando um membro de ligação específica tal como definido acima, e métodos de preparação dos membros de ligação específica do presente invento que compreendem a expressão dos referidos ácidos nucleicos sob condições que levem à expressão do referido membro de ligação e à recuperação do membro de ligação.

Ainda outro aspeto do presente invento são composições de tais proteínas de ligação com proteínas de ligação adicionais, tais como proteínas de ligação que se ligam a EGFR, de preferência inibindo a ligação do ligando a este. Tais composições podem ser misturas de "um frasco", estojos, e por aí adiante, de preferência formuladas para fácil administração.

Os membros de ligação específica de acordo com o presente invento podem ser utilizados num método de tratamento ou diagnóstico do corpo humano ou animal, tal como um método de tratamento de um tumor num paciente humano que compreende a administração ao referido paciente de uma quantidade eficaz de um membro de ligação específica do presente invento.

O presente invento refere-se também a uma molécula de ADN recombinante ou gene clonado, ou uma variante degenerada desta, que codifica um anticorpo do presente invento; de preferência uma molécula de ácido nucleico, em particular uma molécula de ADN recombinante ou gene clonado, codificando o anticorpo VH que possui uma sequência nucleotídica ou é complementar a uma sequência de ADN mostrada na FIGURA 14 (SEQ ID NO:1). Noutra concretização, o presente invento refere-se também a uma molécula de ADN recombinante ou gene clonado, ou

uma variante degenerada desta, de preferência uma molécula de ácido nucleico, em particular uma molécula de ADN recombinante ou gene clonado, codificando o anticorpo VL que possui uma sequência nucleotídica ou é complementar a uma sequência de ADN mostrada na FIGURA 15 (SEQ ID NO:3).

O presente invento inclui também polipéptidos ou anticorpos possuindo as atividades aqui observadas, e que apresentam as sequências de aminoácidos expostas e descritas acima e nas Figuras 14 e 15 aqui e selecionadas a partir de SEQ ID NO:2 e 4.

Noutra concretização do presente invento, a sequência de ADN inteira da molécula de ADN recombinante ou do gene clonado aqui proporcionada pode ser operativamente ligada a uma sequência de controlo da expressão que pode ser introduzida num hospedeiro apropriado. O presente invento estende-se assim a hospedeiros unicelulares transformados com o gene clonado ou a molécula de ADN recombinante compreendendo uma sequência de ADN codificando a presente VH e/ou VL, ou porções destas, do anticorpo, e mais particularmente, a VH e/ou VL expostas acima e em SEQ ID NO:1 e 3.

O presente invento contempla naturalmente vários meios para preparação dos anticorpos e seus fragmentos ativos, incluindo tal como aqui ilustrado técnicas recombinantes conhecidas, e pretende-se assim que o presente invento cubra tais preparações de anticorpos sintéticos ou quiméricos dentro do seu âmbito. O isolamento do ADNc e das sequências de aminoácidos aqui divulgados facilita a reprodução do anticorpo do presente invento através de tais técnicas recombinantes e, assim, o presente invento estende-se a vetores de expressão preparados a partir das sequências de ADN divulgadas para expressão em sistemas hospedeiros através de técnicas de ADN recombinantes, e aos resultantes hospedeiros transformados como estabelecido nas reivindicações.

A presente divulgação proporciona fármacos ou outras entidades, incluindo anticorpos tais como anticorpos anti-idiotípicos, que são capazes de se ligar ao anticorpo, deste modo modulando, inibindo ou potenciando a atividade do anticorpo. Assim, são aqui proporcionados e exemplificados

anticorpos anti-idiotípicos para mAb806. Tais anticorpos anti-idiotípicos seriam úteis no desenvolvimento de fármacos que se ligariam especificamente a anticorpos tais como mAb806 ou ao seu epítopo ou que potenciariam a sua atividade.

A utilidade de diagnóstico do presente invento estende-se à utilização dos anticorpos do presente invento em ensaios para caracterizar tumores ou amostras celulares ou para pesquisar tumores ou cancro, incluindo ensaios de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*.

Num imunoensaio, uma quantidade de controlo dos anticorpos ou semelhantes pode ser preparada e marcada com uma enzima, um parceiro de ligação específica e/ou um elemento radioativo, e pode então ser introduzida numa amostra celular. Após o material marcado ou o seu parceiro ou parceiros de ligação terem tido uma oportunidade para reagir com locais dentro da amostra, a massa resultante pode ser examinada através de técnicas conhecidas, que podem variar com a natureza do marcador ligado.

Os membros de ligação específica do presente invento podem possuir um marcador detetável ou funcional. Os membros de ligação específica podem possuir um marcador radioativo, tal como os isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc e ^{186}Re . Quando são utilizados marcadores radioativos, podem ser utilizados procedimentos de contagem conhecidos atualmente disponíveis para identificar e quantificar os membros de ligação específica. No caso em que o marcador é uma enzima, a deteção pode ser alcançada através de qualquer uma das técnicas colorimétricas, espetrofotométricas, fluoroespetrofotométricas, amperimétricas ou gasométricas conhecidas na arte.

Os membros de ligação específica radiomarcados, particularmente anticorpos e seus fragmentos, são úteis em técnicas de diagnóstico *in vitro* e em técnicas de radioimagiologia *in vivo*. Num outro aspetto do presente invento, os membros de ligação específica radiomarcados, particularmente anticorpos e seus fragmentos, particularmente radioimunoconjungados, são úteis em radioimunoterapia,

particularmente como anticorpos radiomarcados para terapia de cancro. Ainda noutro aspeto, os membros de ligação específica radiomarcados, particularmente anticorpos e seus fragmentos, são úteis em técnicas de cirurgia radioimuno-orientadas, em que podem identificar e indicar a presença e/ou localização de células de cancro, células pré-cancerosas, células tumorais e células hiperproliferativas, antes, durante ou após cirurgia para remover tais células.

Os imunoconjungados ou as proteínas de fusão de anticorpo do presente invento, em que os membros de ligação específica, particularmente anticorpos e seus fragmentos, do presente invento são conjugados ou unidos a outras moléculas ou agentes, incluem ainda, mas não se limitam a membros de ligação conjugados com um agente de ablação química, toxina, imunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente ou fármaco quimioterapêutico.

O presente invento inclui um sistema de ensaio que pode ser preparado na forma de um estojo de teste para a análise quantitativa da extensão da presença, por exemplo, de EGFR ou EGFR de 2-7 amplificado. O sistema ou estojo de teste pode compreender um componente marcado preparado através de uma das técnicas radioativas e/ou enzimáticas aqui discutidas, unindo um marcador ao anticorpo, e um ou mais reagentes imunoquímicos adicionais, pelo menos um dos quais é um componente livre ou imobilizado a determinar ou o seu parceiro ou parceiros de ligação.

Num outro caso, a presente divulgação refere-se a certos métodos terapêuticos que seriam baseados na atividade do membro de ligação, anticorpo ou seus fragmentos ativos, ou em agentes ou outros fármacos que se determine possuírem a mesma atividade. Um primeiro método terapêutico está associado com a prevenção ou o tratamento de cancro, incluindo mas não se limitando a cancro da cabeça e pescoço, da mama, da próstata e glioma.

Em particular, os membros de ligação e anticorpos do presente invento, e numa concretização particular o anticorpo 806 cujas sequências são apresentadas em SEQ ID NO:2 e 4 aqui, ou seus fragmentos ativos, e anticorpos quiméricos

(biespecíficos) ou sintéticos seus derivados podem ser preparados em composições farmacêuticas, incluindo um veículo, transportador ou diluente adequado para administração em casos em que a terapia é apropriada, tal como para tratar cancro. Tais composições farmacêuticas podem também incluir métodos de modulação da semivida dos membros de ligação, anticorpos ou fragmentos através de métodos conhecidos na arte tais como peguilação. Tais composições farmacêuticas podem ainda compreender anticorpos adicionais ou agentes terapêuticos.

Assim, uma composição do presente invento pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, terapêuticos ou agentes, simultaneamente ou sequencialmente dependendo da condição a tratar. Adicionalmente, o presente invento contempla e inclui composições compreendendo o membro de ligação, particularmente o anticorpo ou seu fragmento, aqui descrito, e outros agentes ou terapêuticos tais como agentes ou terapêuticos anticancerosos, agentes anti-EGFR ou anticorpos ou moduladores imunitários. Mais geralmente estes agentes anticancerosos podem ser inibidores de tirosina-quinases ou inibidores da cascata de fosforilação, moduladores pós-tradução, inibidores do crescimento ou da divisão celular (p.ex., antimitóticos), inibidores de PDGFR ou inibidores da transdução de sinal. Outros tratamentos ou terapêuticos podem incluir a administração de doses adequadas de fármacos de alívio da dor tais como fármacos anti-inflamatórios não esteróides (p.ex., aspirina, paracetamol, ibuprofeno ou cetoprofeno) ou opiáceos tais como morfina ou antieméticos. Assim, estes agentes podem ser agentes específicos anti-EGFR, tais como AG1478, ou podem ser agentes anticancerosos e antineoplásicos mais gerais, com exemplos não limitantes a incluir doxorrubicina, carboplatina e cisplatina. Adicionalmente, a composição pode ser administrada com moduladores imunitários, tais como interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF) ou outros fatores de crescimento, citoquinas ou hormonas tais como dexametasona que estimulam a resposta imunitária e a redução ou eliminação de células de cancro ou tumores. A composição pode também ser administrada com ou pode incluir combinações juntamente com outros anticorpos anti-EGFR, incluindo mas não se limitando aos anticorpos anti-EGFR 528; 225; SC-03; 108 (ATCC HB9764) Patente U.S. N.º 6217866; 14E1 (Patente U.S. N.º 5942602);

DH8.3; L8A4; Y10; HuMAX-EGFr (Genmab/Medarex); ICR62; e ABX-EGF (Abgenix).

O presente invento inclui também anticorpos e seus fragmentos, que são covalentemente unidos ou associados de outro modo com outras moléculas ou agentes. Estas outras moléculas ou agentes incluem, mas não se limitam a moléculas (incluindo anticorpos ou fragmentos de anticorpos) com características de reconhecimento distintas, toxinas, ligandos e agentes quimioterapêuticos.

Outros objetos e vantagens tornar-se-ão aparentes aos peritos na especialidade a partir de uma revisão da seguinte descrição detalhada, que prossegue com referência aos seguintes desenhos ilustrativos e às reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A **Figura 1** apresenta os resultados da análise de citometria de fluxo de linhas celulares de glioma. Células U87MG (histogramas a cinzento claro) e U87MG. 2-7 (histogramas a cinzento escuro) foram coradas com um anticorpo IgG2b irrelevante (histogramas vazios), DJ8.3 (específico para EGFR de2-7), mAb 806 ou 528 (liga-se tanto a EGFR de tipo selvagem como de2-7) tal como indicado.

As **Figuras 2A-C** apresentam os resultados de ELISA dos anticorpos mAb 806, DH8.3 e 528. (A) ligação de concentrações crescentes de anticorpo mAb 806 (), DH8.3 () ou 528 () a placas de ELISA revestidas com sEGFR. (B) inibição da ligação de mAb 806 e 528 a placas de ELISA revestidas com sEGFR através de concentrações crescentes de sEGFR em solução. (C) a ligação de concentrações crescentes de DH8.3 ao péptido de junção de2-7 ilustra as curvas de ligação para os anticorpos mAb 806 e 528 ao sEGFR de tipo selvagem imobilizado.

As **Figuras 2D e 2E** apresentam graficamente os resultados dos estudos de ligação BIACore utilizando péptido C-terminal biotinilado e incluindo um anticorpo monoclonal do presente invento, juntamente com outros anticorpos conhecidos, entre eles o anticorpo L8A4 que reconhece o péptido de junção do mutante EGFR de2-7, e controlos.

A **Figura 3** representa a internalização do anticorpo mAb 806 e DH8.3. Células U87MG. -2 foram pré-incubadas com mAb 806 () ou DH8.3 () a 4°C, transferidas para 37°C e a internalização determinada através de FACS. Os dados representam a internalização média em cada momento \pm EP de 3 (DH8.3) ou 4 (mAb 806) experiências separadas.

As **Figuras 4A e 4B** ilustram a biodistribuição (% ID/g de tumor) de (a) mAb 806 radiomarcado com ^{125}I e (b) ^{131}I -DH8.3 em ratinhos nus possuindo xenoenxertos U87MG e U87MG. 2-7. Cada ponto representa a média de 5 ratinhos \pm EP exceto para 1 h onde n=4.

As **Figuras 5A e 5B** ilustram a biodistribuição dos anticorpos ^{125}I -mAb 806 (barra vazia) e ^{131}I -DH8.3 (barra a cheio) radiomarcados expressa como razões (a) tumor:sangue ou (b) tumor:fígado em ratinhos nus possuindo xenoenxertos U87MG. 2-7. Cada barra representa a média de 5 ratinhos \pm EP exceto para 1 h onde n=4.

A **Figura 6** ilustra a análise de citometria de fluxo de linhas celulares contendo amplificação do gene de EGFR. Células A431 foram coradas com mAb 806, DH8.3 ou 528 (histogramas a negro) e comparadas com um anticorpo IgG2b irrelevante (histograma vazio).

As **Figuras 7A e 7B** ilustram a biodistribuição (% ID/g de tumor) de (a) ^{125}I -mAb 806 e (b) ^{131}I -528 radiomarcados em ratinhos nus possuindo xenoenxertos U87MG. 2-7 e A431.

As **Figuras 8A-8D** ilustram a biodistribuição de ^{125}I -mAb 806 (barra vazia) e ^{131}I -528 (barra a cheio) radiomarcados e anticorpos expressos como razões (a,b) tumor:sangue ou (c,d) tumor:fígado em ratinhos nus possuindo xenoenxertos (a,c) U87MG 2-7 e (b,d) A431.

A **Figura 9** ilustra o efeito antitumoral do mAb 806 nas velocidades de crescimento dos xenoenxertos A) U87MG e B) U87MG. 2-7 num modelo preventivo. Foram injetadas s.c. 3×10^6 células U87MG ou U87MG. -2 em ambos os flancos de ratinhos nus BALB/c com 4-6 semanas de idade, (n=5) no dia 0. Os ratinhos foram injetados i.p. com 1 mg de mAb 806 ();

0,1 mg de mAb 806 (); ou veículo () a começar um dia antes da inoculação das células tumorais. As injeções foram dadas três vezes por semana durante duas semanas tal como indicado pelas setas. Os dados são expressos como volume tumoral médio \pm EP.

A **Figura 10** ilustra o efeito antitumoral do mAb 806 nos xenoenxertos A) U87MG, B) U87MG. 2-7 e C) U87MG.wtEGFR num modelo estabelecido. Foram injetadas s.c. 3×10^6 células U87MG, U87MG. 2-7 ou U87MG.wtEGFR, em ambos os flancos de ratinhos nus BALB/c com 4-6 semanas de idade, (n=5). Os ratinhos foram injetados i.p. com doses de 1 mg de mAb 806 (); doses de 0,1 mg de mAb 806 (); ou veículo () a começar quando os tumores alcançavam um volume tumoral médio de 65-80 mm³. As injeções foram dadas três vezes por semana durante duas semanas tal como indicado pelas setas. Os dados são expressos como volume tumoral médio \pm EP.

A **Figura 11** ilustra o efeito antitumoral de mAb 806 em xenoenxertos A431 em modelos A) preventivos e B) estabelecidos. Foram injetadas s.c. 3×10^6 células A431 em ambos os flancos de ratinhos nus BALB/c com 4-6 semanas de idade (n=5). Os ratinhos foram injetados i.p. com doses de 1 mg de mAb 806 (); ou veículo (), a começar um dia antes da inoculação das células tumorais no modelo preventivo ou quando os tumores alcançaram um volume tumoral médio de 200 mm³. As injeções foram dadas três vezes por semana durante duas semanas tal como indicado pelas setas. Os dados são expressos como volume tumoral médio \pm EP.

A **Figura 12** ilustra o efeito antitumoral do tratamento com mAb 806 combinado com tratamento com AG1478 em xenoenxertos A431 num modelo preventivo. Os dados são expressos como volume tumoral médio \pm EP.

A **Figura 13** representa a ligação do anticorpo 806 a células A431 na presença de concentrações crescentes de AG1478 (0,5 μ M e 5 μ M).

A **Figura 14** ilustra a sequência de ácido nucleico e a tradução em aminoácidos desta do gene de VH de 806 (SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, respetivamente).

A **Figura 15** ilustra a sequência de ácido nucleico e a tradução em aminoácidos desta do gene de VL de 806 (SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4, respetivamente).

A **Figura 16** mostra a sequência de VH numerada de acordo com Kabat, com as CDR em caixas. Os resíduos chave de VH são 24, 37, 48, 67 e 78.

A **Figura 17** mostra a sequência de VL numerada de acordo com Kabat, com as CDR em caixas. Os resíduos chave de VL são 36, 46, 57 e 71.

A **Figura 18A-18D** mostra os resultados de estudos *in vivo* desenhados para determinar o efeito terapêutico da terapia de anticorpos de combinação, particularmente o anticorpo mAb806 e 528. Os ratinhos receberam inoculações de células U87MG.D2-7 (**A** e **B**), U87MG.DK (**C**) ou A431 (**D**).

Figura 19 A-D. Análise da internalização através de microscopia eletrónica. Células U87MG. 2-7 foram pré-incubadas com mAb 806 ou DH8.3 seguido de anti-IgG de rato conjugado com ouro a 4°C, transferidas para 37°C e a internalização examinada a vários momentos através de microscopia eletrónica. (**A**) localização do anticorpo DH8.3 numa depressão revestida (seta) após 5 min; (**B**) internalização do mAb 806 através de macropinocitose (seta) após 2 min; (**C**) localização de DH8.3 em lisossomas (seta) após 20 min; (**D**) localização do mAb 806 em lisossomas (seta) após 30 min. A ampliação original para todas as imagens é de ×30000.

Figura 20. Autorradiografia de uma secção de um xenoenxerto de U87MG. 2-7 colhido 8 h após injeção de ^{25}I -mAb 806.

Figura 21. Análise de citometria de fluxo de linhas celulares contendo amplificação do gene de EGFR. Células HN5 e MDA-468 foram coradas com um anticorpo IgG2b irrelevante (histograma vazio com linha a tracejado), mAb 806 (histograma a negro) ou 528 (histograma vazio com linhas fechadas). O anticorpo DH8.3 foi completamente negativo em ambas as linhas celulares (dados não mostrados).

Figura 22. Imunoprecipitação de EGFR a partir de linhas celulares. O EGFR foi imunoprecipitado a partir de células U87MG. 2-7 ou A431 marcadas com³⁵S com anticorpo mAb 806, sc-03 ou um controlo do isotipo IgG2b. As setas ao lado indicam a posição do EGFR de 2-7 e wt. Foram obtidos padrões de bandas idênticos em 3 experiências independentes.

Figura 23. Autorradiografia de uma secção de xenoenxerto de A431 colhida 24 h após injeção de ¹²⁵I-mAb 806, as áreas de localização no tecido viável estão indicadas (setas).

Figura 24A e B. Sobrevida prolongada de ratinhos nus possuindo os xenoenxertos intracranianos U87 MG. EGFR **A**) e LN-Z308. EGFR **B**) com tratamento sistémico com mAb 806. Células U87 MG. EGFR (1×10^6) ou células LN-Z308. EGFR (5×10^5) foram implantadas em cérebros de ratinhos nus, e os animais foram tratados com mAb 806, PBS ou IgG do isotipo desde o dia 0 após a implantação até ao dia 14. **C** e **D**, inibição do crescimento de tumores intracranianos através de tratamento com mAb 806. Ratinhos nus (cinco por grupo), tratados com mAb 806 ou o controlo do isotipo de IgG, foram sujeitos a eutanásia no dia 9 para U87 MG. EGFR **C**) e no dia 15 para LN-Z308. EGFR **D**), e os seus cérebros foram colhidos, fixados e seccionados. Os dados foram calculados tomando o volume do tumor de controlo como 100%. Os valores são a média \pm DP. ***, $P < 0,001$; controlo versus mAb 806. Pontas de seta, tecido tumoral. **E**, sobrevida prolongada dos ratinhos nus possuindo xenoenxertos intracranianos U87 MG. EGFR com tratamento intratumoral com mAb 806. Células U87 MG. EGFR foram implantadas tal como descrito. Foram injetados 10 mg de mAb 806 ou controlo do isotipo de IgG num volume de 5 μ l no local de injeção tumoral dia sim, dia não, a começar no dia 1, por cinco vezes.

Figura 25. O mAb 806 prolonga a sobrevida dos ratinhos com tumores cerebrais U87 MG.wtEGFR mas não com tumores cerebrais U87 MG.DK. ou U87 MG. Células U87 MG (**A**), U87 MG.DK (**B**) ou U87 MG.wtEGFR (**C**) (5×10^5) foram implantadas em cérebros de ratinhos nus, e os animais foram tratados com mAb 806 desde o dia 0 após a implantação até ao dia 14 seguido de observação após descontinuação da terapia.

Figura 26A. Análise de FACS da reatividade do mAb 806 com as linhas celulares U87 MG. Células U87 MG, U87 MG. EGFR, U87 MG.DK e U87 MG.wtEGFR foram coradas com os mAb anti-EGFR 528, EGFR.1 e o anticorpo anti- EGFR, mAb 806. O anticorpo monoclonal EGFR.1 reconheceu exclusivamente wtEGFR e o anticorpo monoclonal 528 reagiu com wtEGFR e EGFR. O mAb 806 reagiu intensivamente com U87 MG. EGFR e U87 MG.DK e fracamente com U87 MG.wtEGFR. Barras nas abscissas, coloração máxima das células na ausência de anticorpo primário. Os resultados foram reproduzidos em três experiências independentes. **B**, imunoprecipitação com mAb 806 de formas de EGFR. O EGFR mutante e wt foram imunoisolados com anticorpos anti-EGFR, 528 ou EGFR.1, ou anticorpo anti- EGFR, mAb 806, de células (Pista 1) U87 MG, (Pista 2) U87 .EGFR, Pista 3) U87 MG.DK, e (Pista 4) U87 MG.wtEGFR e foram então detetados através de *Western blotting* com anticorpo anti-pan EGFR, C13.

Figura 27. O tratamento com mAb 806 conduz a uma diminuição no crescimento e na vasculogénesis e a aumentos na apoptose e acumulação de macrófagos em tumores U87 MG. EGFR. Foram coradas secções tumorais para Ki-67. O índice de proliferação celular foi avaliado através da percentagem de células totais que eram positivas para Ki-67 de quatro campos de elevada potência ($\times 400$) selecionados aleatoriamente em tumores intracranianos de quatro ratinhos de cada grupo. Os dados são a média \pm EP. As células apoptóticas foram detetadas através de ensaio TUNEL. O índice apoptótico foi avaliado através da razão de células positivas em TUNEL:número total de células de quatro campos de elevada potência ($\times 400$) selecionados aleatoriamente em tumores intracranianos de quatro ratinhos de cada grupo. Os dados são a média \pm EP. As secções tumorais foram imunocoradas com anticorpo anti-CD31. Os MVA foram analisados através de análise de imagem computorizada de quatro campos selecionados aleatoriamente ($\times 200$) de tumores intracranianos de quatro ratinhos de cada grupo. Infiltrados peritumorais de macrófagos em tumores U87MG. EGFR tratados com mAb 806. As secções tumorais foram coradas com anticorpo anti-F4/80.

Figura 28. O tratamento sistémico com mAb 806 diminui a fosforilação de EGFR e a expressão de B_{ek}L em tumores cerebrais U87 MG. EGFR. Os tumores U87 MG. EGFR foram

ressecados no dia 9 do tratamento com mAb 806, congelados imediatamente em azoto líquido e armazenados a -80°C antes da preparação do lisado tumoral. **A**, análise Western blot da expressão e do grau de autofosforilação de EGFR. 30 µg de lisados tumorais foram sujeitos a géis de SDS-poliacrilamida, transferidos para membranas de nitrocelulose e sondados com mAb anti-fosfotirosina, depois o anticorpo foi removido e sondou-se novamente com anticorpo anti-BGFR, C13. **B**, Western blotting de Hcl-X_L através da utilização dos mesmos lisados tumorais que em **A**. As membranas foram sondadas com anticorpo policlonal anti-humano Bcl-X. *Pistas 1 e 2*, tumores cerebrais U87 MG. EGFR tratados com controlo de isotipo *Pistas 3 e 4*, tumores cerebrais U87 MG. EGFR tratados com mAb 806.

Figura 29. Análise de citometria de fluxo de linhas celulares de glioma U87 MG parentais e transfectadas. As células foram coradas com um anticorpo IgG2b irrelevante (*histogramas vazios*) ou o anticorpo 528 ou mAb 806 (*histogramas a cheio*) tal como indicado.

Figura 30. Imunoprecipitação de EGFR a partir das linhas celulares. O EGFR foi imunoprecipitado a partir das células U87 MG.wtEGFR, U87 MG. 2-7 e A431 marcadas com³⁵S, com mAb806 (806), anticorpo sc-03 (c-term) ou um controlo do isotipo IgG2b (con). Setas, posição do EGFR de 2-7 e wt.

Figura 31. Secções de parafina representativas coradas com H&E de xenoenxertos U87 MG.2-7 e U87MG.wtEGFR. O xenoenxerto de U87 MG. 2-7 (colhido 24 dias após a inoculação do tumor) e U87 MG.wtEGFR (colhido 42 dias após a inoculação do tumor) foram excisados de ratinhos tratados tal como descrito na Fig. 10 acima e corados com H&E. Os xenoenxertos U87 MG. 2-7 (colhido 18 dias após a inoculação do tumor) e U87 MG.wtEGFR (colhido 37 dias após a inoculação do tumor) tratados com veículo mostraram muito poucas áreas de necrose (*painel esquerdo*), enquanto que foi observada uma necrose extensa (*setas*) em ambos os xenoenxertos U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR tratados com mAb 806 (*painel direito*).

Figura 32. Análise imuno-histoquímica da expressão de EGFR em secções congeladas derivadas dos xenoenxertos U87 MG, U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR. As secções foram colhidas nos

momentos descritos na Fig. 31 acima. As secções dos xenoenxertos foram imunocoradas com o anticorpo 528 (*painel esquerdo*) e mAb 806 (*painel direito*). Não se observou uma redução da imunorreatividade com EGFR wt, EGFR amplificado ou EGFR de2-7 nos xenoenxertos tratados com mAb 806. Consistentemente com os dados *in vitro*, os xenoenxertos U87 MG parentais foram positivos para o anticorpo 528 mas foram negativos para a coloração com mAb 806.

Figura 33. Representação esquemática das construções de expressão bicistrónicas geradas. A transcrição das cadeias do anticorpo quimérico é iniciada através do promotor do Fator de Alongamento-1 e terminada através de uma sequência de terminação artificial forte. Foram introduzidas sequências IRES entre as regiões de codificação da cadeia leve e NeoR e da cadeia pesada e o gene dhfr.

Figura 34. A análise da biodistribuição do ch806 radiomarcado com **A)** ^{125}I ou **B)** ^{111}In foi efetuada em ratinhos nus BALB/c possuindo tumores de xenoenxerto U87MG-de2-7. Os ratinhos foram injetados com 5 μg de anticorpo radiomarcado e em grupos de 4 ratinhos por momento, sacrificados às 8, 28, 48 ou 74 horas. Os órgãos foram colhidos, pesados e a radioatividade foi medida num contador gama.

Figura 35. Representa **(A)** a % ID/grama de tecido tumoral e **(B)** a razão de tumor para sangue. O anticorpo com Índio-111 mostra aproximadamente 30% ID/grama de tecido e uma razão de tumor para sangue de 4,0.

A **Figura 36** representa a eficácia terapêutica do anticorpo quimérico ch806 num modelo de tumor estabelecido. 3×10^6 células U87MG. 2-7 em 100 μl de PBS foram inoculadas s.c. em ambos os flancos de ratinhos nus fêmea de 4-6 semanas de idade. O mAb806 foi incluído como controlo positivo. O tratamento foi iniciado quando os tumores alcançaram um volume médio de 50 mm^3 e consistiam em 1 mg de ch806 ou mAb806 dado i.p. durante um total de 5 injeções nos dias indicados. Os dados foram expressos como volume tumoral médio \pm EP para cada grupo de tratamento.

Figura 37. Atividade de CDC nas células alvo **A)** U87MG.de2-7 e **B)** A431 para anticorpos IgG1 quiméricos anti-EGFR, ch806 e cG250 de controlo. É apresentada a citotoxicidade percentual média (barras; \pm DP) de determinações em triplicado.

Figura 38. ADCC nas células alvo **A)** U87MG.de2-7 e **B)** A431 a uma razão Efector:Célula alvo de 50:1 mediada através de ch806 e do controlo de isotipo cG250 (0-10 μ g/ml). Os resultados são expressos como citotoxicidade percentual média (barras; \pm DP) de determinações em triplicado.

Figura 39. ADCC mediada através de 1 μ g/ml de mAb 806 parental e ch806 nas células alvo U87MG.de2-7 ao longo de um intervalo de razões Efector:Alvo. É apresentada a média (barras; \pm DP) de determinações em triplicado.

Figura 40. Vinte e cinco hibridomas produtores de anticorpos que se ligam a ch806 mas não a huIgG foram inicialmente selecionados. Quatro destes hibridomas anti-ch806 com elevada afinidade de ligação (clones 3E3, 5B8, 9D6 e 4D8) foram subsequentemente seguidos para expansão clonal a partir de células únicas através de diluição limitante e designados *Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hibridoma* (LMH)-11, 12, 13 e 14, respetivamente. Adicionalmente, dois hibridomas que produziram mAb específicos para huIgG foram também clonados e melhor caracterizados: clones 2C10 (LMH-15) e 2B8 (LMH-16).

Figura 41. Após expansão clonal, os sobrenadantes da cultura de hibridoma foram examinados em triplicado através de ELISA quanto à capacidade para neutralizar a atividade de ligação ao antigénio de ch806 ou mAb 806 com sEGFR621. Os resultados médios (\pm DP) demonstraram a atividade antagonista dos mAb anti-idiotípicos LMH-11, 12, 13 e 14 com o bloqueio em solução da ligação de ch806 e mAb 806 de murídeo a placas revestidas com SEGFR (LMH-14 não mostrado).

Figura 42. Placas de microtítulo foram revestidas com 10 μ g/ml de **A)** LMH-11, **B)** LMH-12 e **C)** LMH-13 purificado. Os três clones purificados foram comparados quanto à sua capacidade para capturar ch806 ou mAb 806 em soro ou em FCS a

1%/Meio e depois detetar ch806 ou mAb806 ligado. Anticorpos de controlo do isotipo hu3S193 e m3S193 em soro e FCS a 1%/Meio foram incluídos adicionalmente aos controlos para conjugado secundário avidina-HRP e substrato ABTS. Os resultados são apresentados como média (\pm DP) de amostras em triplicado utilizando LMH-12-biotinilado (10 μ g/ml) para deteção e indicam que o LMH-12 utilizado para captura e deteção tiveram a sensibilidade mais elevada para ch806 em soro (3 ng/ml) com ligação de fundo desprezável.

Figura 43. Validação das condições farmacocinéticas de ELISA ótimas utilizando 1 μ g/ml de LMH-12 anti-idiotípico e 1 μ g/ml de LMH-12 biotinilado para captura e deteção, respetivamente. Foram efetuados três ELISA separados em quadruplicado para medir ch806 no soro de dador () de 6 dadores saudáveis ou BSA a 1%/meio () com controlo do isotipo hu3S193 em soro () ou BSA a 1%/meio (). Os controlos para o conjugado secundário avidina-HRP (♦) e substrato ABTS (hexágono) sozinhos foram também incluídos com cada ELISA. Os resultados médios (\pm DP) demonstram curvas de ligação altamente reprodutíveis para medição de ch806 (2 μ g/ml-1,6 g/ml) em soros com um limite de deteção de 3 ng/ml ($n=12$; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variação <25%; 100 ng/ml-5 μ g/ml, Coeficiente de Variação <15%). Não foi evidente qualquer ligação de fundo com nenhum dos três soros testados e foi observada uma ligação desprezável com o controlo do isotipo hu3S193.

A **Figura 44** representa um *immunoblot* de SEGFR recombinante expresso em células CHO, marcado com mAb806. O SEGFR recombinante foi tratado com PNGaseF para remover a glicosilação ligada em N (desglicosilado) ou não tratado (não tratado), a proteína foi corrida em SDS-PAGE, transferida para a membrana e imunomarcada com mAb 806.

A **Figura 45** representa a imunoprecipitação de EGFR a partir de linhas celulares marcadas com 35 S (U87MG 2-7, U87MG-wtEGFR e A431) com diferentes anticorpos (anticorpos SC-03, 806 e 528).

A **Figura 46** representa a imunoprecipitação de EGFR a partir de diferentes células (A431 e U87MG -2) a diferentes

momentos (tempo 0 a 240 minutos) após marcação por pulsos com ^{35}S -metionina/cisteína. Os anticorpos 528 e 806 são utilizados para imunoprecipitação.

A **Figura 47** representa a imunoprecipitação de EGFR a partir de várias linhas celulares (U87MG 2-7, U87MG-wtEGFR e A431) com vários anticorpos (SC-03, 806 e 528) na ausência de (-) e após digestão com EndoH (+) para remover hidratos de carbono do tipo rico em manose.

A **Figura 48** representa a iodação da superfície celular das linhas celulares A431 e U87MG 2-7 seguida de imunoprecipitação com o anticorpo 806 e com ou sem digestão com EndoH, confirmando que o EGFR ligado ao mAb 806 na superfície celular de células A431 é uma forma sensível a EndoH.

DESCRIÇÃO DETALHADA

De acordo com o presente invento podem ser empregues técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia e ADN recombinante conhecidas dos peritos na especialidade. Tais técnicas são inteiramente explicadas na literatura. Ver, p.ex., Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R.M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J.E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J.E., ed. (1994)]; "Oligonucleótido Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells and Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Por essa razão, se surgirem aqui, os seguintes termos e a expressões deverão ter as definições expostas abaixo.

A. TERMINOLOGIA

A expressão "membro de ligação específica" descreve um membro de um par de moléculas que têm especificidade de ligação uma à outra. Os membros de um par de ligação específica podem ser naturalmente derivados ou completamente ou parcialmente produzidos sinteticamente. Um membro do par de moléculas tem uma área à sua superfície, ou uma cavidade, que se liga especificamente e é portanto complementar a uma determinada organização espacial e polar do outro membro do par de moléculas. Assim os membros do par têm a propriedade de se ligarem especificamente um ao outro. Exemplos de tipos de pares de ligação específica são antigénio-anticorpo, biotina-avidina, hormona-recetor de hormona, recetor-ligando, enzima-substrato. Este pedido está relacionado com reações de tipo antigénio-anticorpo.

A expressão "expressão aberrante" nas suas várias formas gramaticais pode significar e incluir qualquer expressão elevada ou alterada ou sobre-expressão de uma proteína num tecido, p.ex. um aumento na quantidade de uma proteína, causado por qualquer meio incluindo maior expressão ou tradução, modulação do promotor ou um regulador da proteína, amplificação de um gene para uma proteína ou maior semivida ou estabilidade, de modo a que exista ou possa ser detetada em qualquer momento mais dessa proteína, em contraste com um estado não sobre-expresso. Expressão aberrante inclui e contempla qualquer cenário ou alteração em que a maquinaria de expressão proteica ou de modificação pós-tradução numa célula seja abrandada ou de outro modo parada devido a maior expressão ou níveis ou quantidades mais elevados de uma proteína, incluindo quando seja expressa uma proteína alterada, tal como numa proteína mutada ou variante devido a alteração, deleção ou inserção na sequência ou dobragem alterada.

É importante notar que a expressão "expressão aberrante" foi especificamente escolhida aqui para englobar o estado em que estão presentes quantidades/níveis anormais (habitualmente aumentados) da proteína, independentemente da causa eficiente dessa quantidade ou nível anormal. Assim, quantidades anormais da proteína podem resultar de sobre-expressão da proteína na

ausência de amplificação génica, que é o caso p.ex. em muitas amostras celulares/de tecido da cabeça e pescoço de sujeitos com cancro, ao mesmo tempo que outras amostras exibem níveis anormais de proteína atribuíveis a amplificação génica.

Nesta última relação, parte do trabalho dos inventores que é aqui apresentado para ilustrar o presente invento inclui a análise de amostras das quais certas exibem níveis anormais de proteína resultantes de amplificação de EGFR. Isto contribui portanto para a apresentação aqui de descobertas experimentais onde é feita referência a amplificação e para a utilização dos termos "amplificação/amplificado" e semelhantes na descrição de níveis anormais de EGFR. No entanto, é a observação de quantidades ou níveis anormais da proteína que define o ambiente ou a circunstância onde a intervenção clínica, tal como por recurso aos membros de ligação do presente invento, está contemplada e, por esta razão, o presente fascículo considera que a expressão "expressão aberrante" capta mais amplamente o ambiente causal que produz a correspondente anomalia nos níveis de EGFR.

Assim, embora os termos "sobre-expressão" e "amplificação" nas suas várias formas gramaticais sejam entendidos como tendo significados técnicos distintos, eles devem ser considerados equivalentes um ao outro, na medida em que representem o estado em que estão presentes níveis anormais de proteína EGFR no contexto do presente invento. Consequentemente, a expressão "expressão aberrante" foi escolhida por se crer que engloba os termos "sobre-expressão" e "amplificação" dentro do seu âmbito para os presentes fins, para que todos os termos possam ser considerados equivalentes uns aos outros tal como aqui se utilizam.

O termo "anticorpo" descreve uma imunoglobulina natural ou parcialmente ou totalmente produzida sinteticamente. O termo cobre também qualquer polipéptido ou proteína possuindo um domínio de ligação que seja, ou seja homólogo a, um domínio de ligação de anticorpo. Anticorpos com CDR enxertadas são também contemplados por este termo.

Os anticorpos podem ser modificados de vários modos, o termo "anticorpo" deve ser entendido como cobrindo qualquer

membro de ligação específica ou substância possuindo um domínio de ligação com a especificidade requerida. Assim, este termo cobre fragmentos de anticorpo, derivados, equivalentes funcionais e homólogos de anticorpos, incluindo qualquer polipéptido compreendendo um domínio de ligação de imunoglobulina, natural ou totalmente ou parcialmente sintético. Moléculas quiméricas compreendendo um domínio de ligação de imunoglobulina ou equivalente, fundidas com outro polipéptido estão portanto incluídas. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas em EP-A-0120694 e EP-A-0125023 e Patentes U.S. N.º 4816397 e 4816567.

Mostrou-se que fragmentos de um anticorpo inteiro podem efetuar a função de ligação aos抗原s. Exemplos de fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iii) o fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb (Ward, E.S. et al., *Nature* 341: 544-546, 1989) que consiste num domínio de VH; (v) regiões CDR isoladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados; (vii) moléculas Fv de cadeia simples (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL estão ligados por um ligante peptídico que permite que os dois domínios se associem para formar um local de ligação ao抗原 (Bird et al., *Science* 242: 423-426, 1988; Huston et al., *PNAS USA* 85: 5879-5883, 1988); (viii) fragmentos de anticorpo multivalentes (dímeros, trímeros e/ou tetrâmeros de scFv (Power e Hudson, *J. Immunol. Methods* 242: 193-204, 2000)); (ix) dímeros de Fv de cadeia simples biespecíficos (PCT/US92/09965); e (x) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos através de fusão de genes (WO 94/13804; P. Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993).

Um "local de combinação do anticorpo" é a porção estrutural de uma molécula de anticorpo constituída pelas regiões variáveis e hipervariáveis da cadeia leve ou da cadeia pesada e leve que se ligam especificamente ao抗原.

A expressão "molécula de anticorpo" nas suas várias formas gramaticais tal como aqui se utiliza contempla tanto

uma molécula de imunoglobulina intacta como uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina.

Moléculas de anticorpo exemplares são moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e as porções de uma molécula de imunoglobulina que contêm o paratopo, incluindo as porções conhecidas na arte como Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v), cujas porções são preferidas para utilizar nos métodos terapêuticos aqui descritos.

Os anticorpos podem também ser biespecíficos, em que um domínio de ligação do anticorpo é um membro de ligação específica do presente invento e o outro domínio de ligação tem uma especificidade diferente, p.ex. recrutar uma função efectora ou semelhante. Os anticorpos biespecíficos do presente invento incluem aqueles em que um domínio de ligação do anticorpo é um membro de ligação específica do presente invento, incluindo um seu fragmento, e o outro domínio de ligação é um anticorpo distinto ou seu fragmento, incluindo um de um anticorpo anti-EGFR distinto, por exemplo o anticorpo 528 (Patente U.S. N.º 4943533), o anticorpo 225 quimérico e humanizado (Patente U.S. N.º 4943533 e WO 96/40210), um anticorpo anti-de2-7 tal como DH8.3 (Hills, D. et al., *Int. J. Cancer* 63(4): 537-543, 1995), anticorpo L8A4 e Y10 (Reist, CJ et al., *Cancer Res.* 55(19): 4375-4382, 1995; Foulon CF et al., *Cancer Res.* 60(16): 4453-4460, 2000), ICR62 (Modjtahedi, H. et al., *Cell Biophys.* Jan-Jun; 22(1.3): 129-46, 1993; Modjtahedi et al., *P.A.A.C.R.* 55(14): 3140-3148, 2002) ou o anticorpo de Wikstrand et al. (Wikstrand, C. et al., *Cancer Res.* 55(14): 3140-3148, 1995). O outro domínio de ligação pode ser um anticorpo que reconheça ou se direccione a um determinado tipo celular, tal como num anticorpo específico de células neurais ou gliais. Nos anticorpos biespecíficos do presente invento o domínio de ligação do anticorpo do presente invento pode ser combinado com outros domínios de ligação ou moléculas que reconheçam determinados receptores celulares e/ou modulem células de um determinado modo, tal como por exemplo um modulador imunitário (p.ex., interleucina(s)), um modulador de crescimento ou citoquina (p.ex., fator de necrose tumoral (TNF) e, particularmente, a modalidade biespecífica de TNF demonstrada em U.S.S.N. 60/355838 apresentada a 13 de

Fevereiro de 2002 ou uma toxina (p.ex., rícino) ou um agente ou fator antimitótico ou apoptótico.

As porções Fab e $F(ab')_2$ de moléculas de anticorpo podem ser preparadas através da reação proteolítica da papaína e pepsina, respetivamente, em moléculas de anticorpo substancialmente intactas através de métodos que são bem conhecidos. Ver por exemplo, Patente U.S. N.º 4342566 de Theofilopolous *et al.* As porções Fab' das moléculas de anticorpo são também bem conhecidas e são produzidas a partir de porções $F(ab')_2$ seguidas de redução das ligações dissulfureto que ligam as duas porções de cadeias pesadas tal como com mercaptoetanol e seguido de alquilação da proteína resultante mercaptano com um reagente tal como iodoacetamida. É aqui preferido um anticorpo contendo moléculas de anticorpo intactas.

A frase "anticorpo monoclonal" nas suas várias formas gramaticais refere-se a um anticorpo possuindo apenas uma espécie de local de combinação do anticorpo capaz de imunorreagir com um determinado抗原. Um anticorpo monoclonal apresenta assim tipicamente uma única afinidade de ligação para qualquer抗原 com o qual imunorreage. Um anticorpo monoclonal pode também conter uma molécula de anticorpo possuindo uma variedade de locais de combinação do anticorpo, cada um imunoespecífico para um抗原 diferente, p.ex., um anticorpo monoclonal biespecífico (quimérico).

A expressão "domínio de ligação ao抗原" descreve a parte de um anticorpo que compreende a área que se liga especificamente e é complementar a parte ou a todo o抗原. Quando um抗原 é grande, um anticorpo pode ligar-se a apenas uma determinada parte do抗原, cuja parte é designada um epítopo. Um domínio de ligação ao抗原 pode ser proporcionado por um ou mais domínios variáveis do anticorpo. De preferência, um domínio de ligação ao抗原 compreende uma região variável da cadeia leve do anticorpo (VL) e uma região variável da cadeia pesada do anticorpo (VH).

"Modificação pós-tradução" pode englobar qualquer uma ou uma combinação de modificações, incluindo modificação covalente, que uma proteína sofre após a tradução estar completa e após ser libertada do ribossoma ou no polipeptídeo nascente durante a tradução. A modificação pós-tradução inclui mas não se limita a fosforilação, miristilação, ubiquitinação, glicosilação, união de coenzima, metilação e acetilação. A modificação pós-tradução pode modular ou influenciar a atividade de uma proteína, o seu destino intracelular ou extracelular, a sua estabilidade ou semivida e/ou o seu reconhecimento pelos ligandos, receptores ou outras proteínas. A modificação pós-tradução pode ocorrer em organelos celulares, no núcleo ou citoplasma ou extracelularmente.

O termo "específico" pode ser utilizado para referir a situação em que um membro de um par de ligação específica não mostrará qualquer ligação significativa a outras moléculas para além do seu parceiro ou parceiros de ligação específica. O termo é também aplicável quando p.ex. um domínio de ligação ao antígeno é específico para um determinado epítopo que seja possuído por vários antígenos, caso em que o membro de ligação específica possuindo o domínio de ligação ao antígeno será capaz de se ligar aos vários antígenos possuindo o epítopo.

O termo "compreende" é geralmente utilizado no sentido de incluir, o mesmo é dizer permitir a presença de uma ou mais características ou componentes.

A expressão "consistindo essencialmente em" refere-se a um produto, particularmente uma sequência peptídica, com um número de resíduos definido que não esteja covalentemente unida a um produto maior. No caso do péptido da divulgação referido acima, os peritos na especialidade apreciarão que modificações menores no terminal N ou C do péptido possam, no entanto, estar contempladas, tal como a modificação química do terminal para adicionar um grupo protetor ou semelhante, p.ex., a amidação do terminal C.

O termo "isolado" refere-se ao estado em que estarão os membros de ligação específica do presente invento ou ácido nucleico codificando tais membros de ligação, de acordo com o

presente invento. Os membros e o ácido nucleico estarão livres ou substancialmente livres de material com o qual estão naturalmente associados tais como outros polipéptidos ou ácidos nucleicos com os quais se encontram no seu ambiente natural ou no ambiente em que são preparados (p.ex., cultura celular) quando essa preparação é através de tecnologia de ADN recombinante praticada *in vitro* ou *in vivo*. Os membros e o ácido nucleico podem ser formulados com diluentes ou adjuvantes e ainda, para fins práticos, ser isolados - por exemplo os membros serão normalmente misturados com gelatina ou outros transportadores se utilizados para revestir placas de microtitulação para utilizar em imunoensaios ou serão misturados com transportadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis quando utilizados em diagnóstico ou terapia. Os membros de ligação específica podem ser glicosilados, naturalmente ou através de sistemas de células eucarióticas heterólogas, ou podem ser (por exemplo se produzidos através de expressão numa célula procariótica) não glicosilados.

Também, tal como aqui se utiliza, os termos "glicosilação" e "glicosilado" incluem e englobam a modificação pós-tradução de proteínas, designadas glicoproteínas, através de adição de oligossacáridos. Os oligossacáridos são adicionados em locais de glicosilação em glicoproteínas, particularmente incluindo oligossacáridos ligados em N e oligossacáridos ligados em O. Os oligossacáridos ligados em N são adicionados a um resíduo de Asn, particularmente em que o resíduo de Asn está na sequência N-X-S/T, onde X não pode ser Pro nem Asp, e são os mais comuns encontrados em glicoproteínas. Na biossíntese das glicoproteínas ligadas em N, um oligossacárido do tipo rico em manose (geralmente constituído por dolícol, N-Acetylglucosamina, manose e glicose) é primeiro formado no retículo endoplasmático (RE). As glicoproteínas do tipo rico em manose são então transportadas do RE para o Golgi, onde ocorre mais processamento e modificação dos oligossacáridos. Os oligossacáridos ligados em O são adicionados ao grupo hidroxilo de resíduos Ser ou Thr. Nos oligossacáridos ligados em O, a N-Acetylglucosamina é primeiro transferida para o resíduo Ser ou Thr através da N-Acetylglucosaminiltransferase no RE. A proteína move-se então para o Golgi onde ocorre mais modificação e alongamento da cadeia. As modificações ligadas

em O podem ocorrer com a adição simples do monossacárido OGlcNAc sozinho nos locais Ser ou Thr que podem também ser, sob condições diferentes, fosforilados em vez de glicosilados.

Tal como aqui se utiliza "pg" significa picograma, "ng" significa nanograma, "ug" ou "µg" significam micrograma, "mg" significa miligrama, "ul" ou "µl" significam microlitro, "ml" significa mililitro, "l" significa litro.

Os termos "anticorpo 806", "mAb806", "ch806" e quaisquer variantes não especificamente listadas, podem ser aqui utilizados indiferentemente e tal como são utilizados ao longo do presente pedido e reivindicações referem-se a material proteináceo incluindo proteínas simples ou múltiplas e estende-se às proteínas possuindo os dados da sequência de aminoácidos aqui descritos e apresentados em SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4, e ao anticorpo quimérico ch806 que é incorporado e forma uma parte de SEQ ID NO:7 e 8 e ao perfil de atividades exposto aqui e nas Reivindicações. Assim, proteínas mostrando atividade substancialmente equivalente ou alterada estão de igual modo contempladas. Estas modificações podem ser deliberadas, por exemplo, tais como modificações obtidas através de mutagénese dirigida ao local, ou podem ser acidentais, tais como as obtidas através de mutações em hospedeiros que sejam produtores do complexo ou das suas subunidades nomeadas. Pretende-se também que os termos "anticorpo 806", "mAb806" e "ch806" incluam dentro do seu âmbito proteínas especificamente aqui citadas bem como todos os análogos substancialmente homólogos e variações alélicas.

É preferido que os resíduos de aminoácidos aqui descritos estejam na forma isomérica "L". No entanto, os resíduos na forma isomérica "D" podem ser substituídos por qualquer resíduo de L-aminoácido, desde que a propriedade funcional desejada de ligação à imunoglobulina seja mantida pelo polipéptido. NH₂ refere-se ao grupo amino livre presente no terminal amino de um polipéptido. COOH refere-se ao grupo carboxilo livre presente no terminal carboxilo de um polipéptido. Para manter a nomenclatura de polipéptidos padrão, *J. Biol. Chem.* 243: 3552-59, 1969, as abreviaturas para os resíduos de aminoácidos são mostradas na seguinte Tabela de Correspondências:

TABELA DE CORRESPONDÊNCIAS

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
<u>1 Letra</u>	<u>3 Letras</u>	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutâmico
W	Trp	triptofano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Deve notar-se que todas as sequências de resíduos de aminoácidos estão aqui representadas pelas fórmulas cuja orientação esquerda e direita está no sentido convencional do terminal amino para o terminal carboxilo. Para além disso, deve notar-se que um traço no início ou no fim de uma sequência de resíduos de aminoácidos indica uma ligação peptídica a uma outra sequência de um ou mais resíduos de aminoácidos. A Tabela de cima é apresentada para correlacionar as notações de três letras e de uma letra que podem aqui surgir indiferentemente.

Um "replicão" é qualquer elemento genético (p.ex., plasmídeo, cromossoma, vírus) que funcione como uma unidade autónoma de replicação de ADN *in vivo*; i.e., capaz de replicação sob o seu próprio controlo.

Um "vetor" é um replicão, tal como plasmídeo, fago ou cosmídeo, ao qual outro segmento de ADN pode ser unido para levar à replicação do segmento unido.

Uma "molécula de ADN" refere-se à forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina ou citosina) na sua forma de cadeia simples ou numa hélice de cadeia dupla. Este termo refere-se apenas à estrutura primária e secundária da molécula e não a limita a quaisquer formas terciárias particulares. Assim, este termo inclui ADN de cadeia dupla encontrado, *inter alia*, em moléculas de ADN lineares (p.ex., fragmentos de restrição), vírus, plasmídeos e cromossomas. Na discussão da estrutura de determinadas moléculas de ADN de cadeia dupla, as sequências podem ser aqui descritas de acordo com a convenção normal de dar apenas a sequência no sentido de 5' para 3' ao longo da cadeia de ADN não transcrita (i.e., a cadeia possuindo uma sequência homóloga ao ARNm).

Uma "origem de replicação" refere-se às sequências de ADN que participam na síntese de ADN.

Uma "sequência de codificação" de ADN é uma sequência de ADN de cadeia dupla que é transcrita e traduzida num polipéptido *in vivo* quando colocada sob o controlo das sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um codão de início no terminal 5' (amino) e um codão de terminação da tradução no terminal 3' (carboxilo). Uma sequência de codificação pode incluir, mas não se limita a, sequências procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, sequências de ADN genómico de ADN eucariótico (p.ex., de mamífero) e mesmo sequências de ADN sintéticas. Um sinal de poliadenilação e a sequência de terminação da transcrição estarão habitualmente localizados a 3' da sequência de codificação.

As sequências de controlo da transcrição e da tradução são sequências reguladoras do ADN, tais como promotores, estimuladores, sinais de poliadenilação, terminadores e semelhantes, que proporcionam a expressão de uma sequência de codificação numa célula hospedeira.

Uma "sequência promotora" é uma região reguladora do ADN capaz de se ligar a ARN-polimerase numa célula e iniciar a transcrição de uma sequência de codificação a jusante (sentido 3'). Para fins de definição do presente invento, a sequência promotora está ligada no seu terminal 3' pelo local de início da transcrição e estende-se para montante (sentido 5') para incluir o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição a níveis detetáveis acima do fundo. Dentro da sequência promotora será encontrado um local de início da transcrição (convenientemente definido através de mapeamento com nuclease S1), bem como domínios de ligação a proteínas (sequências de consenso) responsáveis pela ligação da ARN-polimerase. Os promotores eucarióticos, conterão frequentemente, mas nem sempre, caixas "TATA" e caixas "CAT". Os promotores procarióticos contêm sequências de Shine-Dalgarno para além das sequências de consenso -10 e -35.

Uma "sequência de controlo da expressão" é uma sequência de ADN que controla e regula a transcrição e tradução de outra sequência de ADN. Uma sequência de codificação está "sob o controlo" de sequências de controlo da transcrição e tradução numa célula quando a ARN-polimerase transcreve a sequência de codificação em ARNm, que é então traduzido na proteína codificada pela sequência de codificação.

Uma "sequência sinal" pode ser incluída antes da sequência de codificação. Esta sequência codifica um péptido de sinal, N-terminal ao polipéptido, que comunica com a célula hospedeira para dirigir o polipéptido para a superfície celular ou segregar o polipéptido para o meio, e este péptido de sinal é removido pela célula hospedeira antes de a proteína deixar a célula. As sequências sinal podem ser encontrar-se associadas a uma variedade de proteínas nativas dos procariotas e eucariotas.

O termo "oligonucleótido," tal como aqui se utiliza em relação à sonda da presente divulgação, é definido como uma molécula constituída por dois ou mais ribonucleótidos, de preferência mais de três. O seu tamanho exato dependerá de muitos fatores que, por sua vez, dependem da função e utilização final do oligonucleótido.

O termo "iniciador" tal como aqui se utiliza refere-se a um oligonucleótido, de ocorrência natural como numa digestão de restrição purificada ou produzido sinteticamente, que seja capaz de atuar como um ponto de início da síntese quando colocado sob condições em que a síntese de um produto de extensão de um iniciador, que seja complementar a uma cadeia de ácido nucleico, é induzida, i.e., na presença de nucleótidos e um agente indutor tal como uma ADN-polimerase e a uma temperatura e pH adequados. O iniciador pode ser de cadeia simples ou de cadeia dupla e tem de ser suficientemente comprido para iniciar a síntese do produto de extensão desejado na presença do agente indutor. O comprimento exato do iniciador dependerá de muitos fatores, incluindo a temperatura, fonte do iniciador e utilização do método. Por exemplo, para aplicações de diagnóstico, dependendo da complexidade da sequência alvo, o iniciador oligonucleotídico contém tipicamente 15-25 ou mais nucleótidos, embora possa conter menos nucleótidos.

Os iniciadores aqui são selecionados para serem "substancialmente" complementares a diferentes cadeias de uma determinada sequência de ADN alvo. Isto significa que os iniciadores têm de ser suficientemente complementares para hibridarem com as suas respetivas cadeias. Por essa razão, a sequência iniciadora não necessita de refletir a sequência exata do molde. Por exemplo, um fragmento nucleotídico não complementar pode ser unido à extremidade 5' do iniciador, sendo o restante da sequência iniciadora complementar à cadeia. Alternativamente, podem ser interpostas bases não complementares ou sequências mais compridas no iniciador, desde que a sequência iniciadora tenha complementaridade suficiente com a sequência da cadeia com que hibrida e deste modo forme o molde para a síntese do produto de extensão.

Tal como aqui se utilizam, as expressões "endonucleases de restrição" e "enzimas de restrição" referem-se a enzimas bacterianas, cada uma das quais corta ADN de cadeia dupla numa sequência nucleotídica específica ou próximo desta.

Uma célula foi "transformada" com ADN exógeno ou heterólogo quando tal ADN foi introduzido dentro da célula. O ADN transformante pode ou não ser integrado (ligado

covalentemente) no ADN cromossómico fazendo parte do genoma da célula. Em procariotas, levedura e células de mamífero, por exemplo, o ADN transformante pode ser mantido num elemento epissómico tal como um plasmídeo. Em relação às células eucarióticas, uma célula estavelmente transformada é uma em que o ADN transformante se torna integrado num cromossoma para que seja herdado pelas células filhas através da replicação cromossómica. Esta estabilidade é demonstrada através da capacidade da célula eucariótica para estabelecer linhas celulares ou clones constituídos por uma população de células filhas contendo o ADN transformante. Um "clone" é uma população de células derivada de uma única célula ou ancestral comum através de mitose. Uma "linha celular" é um clone de uma célula primária que é capaz de crescimento estável *in vitro* durante muitas gerações.

Duas sequências de ADN são "substancialmente homólogas" quando pelo menos cerca de 75% (de preferência pelo menos cerca de 80% e de maior preferência pelo menos cerca de 90 ou 95%) dos nucleótidos coincidem ao longo de um comprimento definido das sequências de ADN. As sequências que são substancialmente homólogas podem ser identificadas através de comparação das sequências utilizando suporte lógico padrão disponível em bancos de dados de sequências ou numa experiência de hibridação de *Southern* sob, por exemplo, condições rigorosas tal como definido para esse sistema particular. A definição das condições de hibridação apropriadas está dentro da perícia na arte. Ver, p.ex., Maniatis *et al.*, *supra*; "DNA Cloning", Vols. I & II, *supra*; "Nucleic Acid Hybridization", *supra*.

Deverá ser apreciado que também estão dentro do âmbito do presente invento sequências de ADN codificando membros de ligação específica (anticorpos) do presente invento que codifiquem p.ex. um anticorpo possuindo a mesma sequência de aminoácidos que SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4, mas que sejam degeneradas em relação a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4. Por "degeneradas em relação a" entenda-se que é utilizado um codão de três letras diferente para especificar um determinado aminoácido. É bem conhecido na arte que os seguintes codões podem ser utilizados indiferentemente para codificar para cada aminoácido específico:

Fenilalanina (Phe ou F)	UUU ou UUC
Leucina (Leu ou L)	UUA ou UUG ou CUU ou CUC ou CUA ou CUG
Isoleucina (Ile ou I)	AUU ou AUC ou AUA
Metionina (Met ou M)	AUG
Valina (Val ou V)	GUU ou GUC ou GUA ou GUG
Serina (Ser ou S)	UCU ou UCC ou UCA ou UCG ou AGU ou AGC
Prolina (Pro ou P)	CCU ou CCC ou CCA ou CCG
Treonina (Thr ou T)	ACU ou ACC ou ACA ou ACG
Alanina (Ala ou A)	GCU ou GCG ou GCA ou GCG
Tirosina (Tyr ou Y)	UAU ou UAC
Histidina (His ou H)	CAU ou CAC
Glutamina (Gln ou Q)	CAA ou CAG
Asparagina (Asn ou N)	AAU ou AAC
Lisina (Lys ou K)	AAA ou AAG
Ácido aspártico (Asp ou D)	GAU ou GAC
Ácido glutâmico (Glu ou E)	GAA ou GAG
Cisteína (Cys ou C)	UGU ou UGC
Arginina (Arg ou R)	CGU ou CGC ou CGA ou CGG ou AGA ou AGG
Glicina (Gly ou G)	GGU ou GGC ou GGA ou GGG
Triptofano (Trp ou W)	UGG
Codão de Terminação	UAA (ocre) ou UAG (âmbar) ou UGA (opala)

Deve entender-se que os codões especificados acima são para sequências de ARN. Os codões correspondentes para ADN têm um T substituído por U.

Podem ser feitas mutações em SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 para que um determinado codão seja mudado para um codão que codifique para um aminoácido diferente. Uma tal mutação é geralmente feita através das menores alterações de nucleótidos possíveis. Uma mutação por substituição deste tipo pode ser feita para alterar um aminoácido na proteína resultante de um modo não conservativo (i.e., através da mudança do codão de um aminoácido pertencente a um agrupamento de aminoácidos possuindo um determinado tamanho ou característica num aminoácido pertencente a outro agrupamento) ou de um modo conservativo (i.e., através da mudança do codão de um aminoácido pertencente a um agrupamento de aminoácidos possuindo um determinado tamanho ou característica num aminoácido pertencente ao mesmo agrupamento). Uma tal

alteração conservativa conduz geralmente a menos alteração na estrutura e função da proteína resultante. É mais provável que uma mudança não conservativa altere a estrutura, atividade ou função da proteína resultante. O presente invento deve ser considerado como incluindo sequências contendo alterações conservativas que não alterem significativamente a atividade ou características de ligação da proteína resultante.

O seguinte é um exemplo de vários agrupamentos de aminoácidos:

Aminoácidos com grupos R não polares

Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptofano, Metionina

Aminoácidos com grupos R polares sem carga

Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina

Aminoácidos com grupos R polares com carga (carga negativa a pH 6,0)

Ácido aspártico, Ácido glutâmico

Aminoácidos básicos (carga positiva a pH 6,0)

Lisina, Arginina, Histidina (a pH 6,0)

Outro agrupamento pode ser dos aminoácidos com grupos fenilo:

Fenilalanina, Triptofano, Tirosina

Outro agrupamento pode ser de acordo com o peso molecular (i.e., tamanho dos grupos R):

Glicina	75
Alanina	89
Serina	105
Prolina	115
Valina	117
Treonina	119
Cisteína	121
Leucina	131

Isoleucina	131
Asparagina	132
Ácido aspártico	133
Glutamina	146
Lisina	146
Ácido glutâmico	147
Metionina	149
Histidina (a pH 6,0)	155
Fenilalanina	165
Arginina	174
Tirosina	181
Triptofano	204

As substituições particularmente preferidas são:

- Arg por Lys e vice-versa para que a carga positiva possa ser mantida;
- Asp por Glu e vice-versa para que a carga negativa possa ser mantida;
- Thr por Ser para que o -OH livre possa ser mantido; e
- Asn por Gln para que o NH₂ livre possa ser mantido.

As substituições de aminoácidos podem também ser introduzidas para substituir um aminoácido com uma propriedade particularmente preferida. Por exemplo, um Cys pode ser introduzido como potencial local para pontes dissulfureto com outro Cys. Um His pode ser introduzido como local particularmente "catalítico" (i.e., His pode atuar como ácido ou base e é o aminoácido mais comum em catálise bioquímica). Pro pode ser introduzido devido à sua estrutura particularmente plana, que induz voltas na estrutura da proteína.

Duas sequências de aminoácidos são "substancialmente homólogas" quando pelo menos cerca de 70% dos resíduos de aminoácidos (de preferência pelo menos cerca de 80% e de maior preferência pelo menos cerca de 90 ou 95%) são idênticos ou representam substituições conservativas.

Uma região "heteróloga" da construção de ADN é um segmento identificável de ADN dentro de uma molécula de ADN

maior que não se encontra em associação com a molécula maior na natureza. Assim, quando a região heteróloga codifica um gene de mamífero, o gene estará habitualmente flanqueado por ADN que não flanqueia o ADN genómico de mamífero no genoma do organismo fonte. Outro exemplo de uma sequência de codificação heteróloga é uma construção onde a própria sequência de codificação não se encontra na natureza (p.ex., um ADNc onde a sequência de codificação genómica contém intrões ou sequências sintéticas possuindo codões diferentes dos do gene nativo). As variações alélicas ou os eventos mutacionais de ocorrência natural não dão origem a uma região heteróloga do ADN tal como aqui definido.

A frase "farmaceuticamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que são fisiologicamente toleráveis e do não produzem tipicamente uma reação adversa alérgica ou semelhante, tal como perturbação gástrica, vertigem e semelhantes, quando administradas a um humano.

A frase "quantidade terapeuticamente eficaz" é aqui utilizada para significar uma quantidade suficiente para prevenir e de preferência reduzir em pelo menos cerca de 30 porcento, de preferência em pelo menos 50 porcento, de preferência em pelo menos 70 porcento, de preferência em pelo menos 80 porcento, de preferência em pelo menos 90%, uma alteração clinicamente significativa no crescimento ou na progressão da atividade mitótica de uma massa celular alvo, grupo de células de cancro ou tumor ou outra característica de patologia. Por exemplo, o grau de ativação ou atividade de EGFR ou a quantidade ou o número de células positivas para EGFR, particularmente de anticorpo ou membro de ligação reativo, ou de células positivas pode ser reduzido.

Uma sequência de ADN está "operativamente ligada" a uma sequência de controlo da expressão quando a sequência de controlo da expressão controla e regula a transcrição e tradução dessa sequência de ADN. A expressão "operativamente ligada" inclui ter um sinal de início apropriado (p.ex., ATG) à frente da sequência de ADN a expressar e manter o enquadramento de leitura correto para permitir a expressão da sequência de ADN sob o controlo da sequência de controlo da expressão e a produção do produto desejado codificado pela

sequência de ADN. Se um gene que se deseja inserir numa molécula de ADN recombinante não contiver um sinal de início apropriado, um tal sinal de início pode ser inserido à frente do gene.

A expressão "condições de hibridação padrão" refere-se a condições de sal e temperatura substancialmente equivalentes a SSC 5× e 65°C para hibridação e lavagem. No entanto, um perito na especialidade apreciará que tais "condições de hibridação padrão" estão dependentes de condições particulares incluindo a concentração de sódio e magnésio no tampão, comprimento e concentração da sequência nucleotídica, percentagem de emparelhamentos errados, percentagem de formamida e semelhantes. Também importante na determinação das "condições de hibridação padrão" é se as duas sequências que hibridam são ARN-ARN, ADN-ADN ou ARN-ADN. Tais condições de hibridação padrão são facilmente determinadas por um perito na especialidade de acordo com fórmulas bem conhecidas, em que a hibridação é tipicamente 10-20°C abaixo da T_f prevista ou determinada com lavagens de maior rigor, se desejado.

B. DESCRIÇÃO DETALHADA

O presente invento proporciona um anticorpo isolado ou seu fragmento ativo, em que o referido anticorpo isolado ou o seu fragmento ativo: (a) se liga ao EGFR humano de tipo selvagem ligado às células quando o gene do EGFR é amplificado; (b) se liga a EGFR de 2-7 num epítopo distinto do péptido de junção LEEKKGNVVTDH; (c) não se liga a células de tipo selvagem que expressam EGFR endógeno; e (d) reconhece um epítopo dentro da sequência de resíduos 273-501 do EGFR humano de tipo selvagem.

O novo membro de ligação específica do presente invento, particularmente um anticorpo ou seu fragmento, incluindo fragmentos imunogénicos, reconhece um epítopo de EGFR que se encontra em células tumorigénicas, hiperproliferativas ou anormais em que o epítopo é aumentado ou evidente após modificação pós-tradução aberrante e não detetável em células normais ou de tipo selvagem. Numa concretização particular mas não limitante, o membro de ligação, tal como o anticorpo, reconhece um epítopo de EGFR que está aumentado ou evidente

após simples modificação dos hidratos de carbono ou glicosilação inicial e está reduzido ou não evidente na presença de modificação complexa dos hidratos de carbono ou glicosilação. O membro de ligação específica, tal como o anticorpo ou seu fragmento, não se liga ou reconhece células normais ou de tipo selvagem contendo o epítopo de EGFR normal ou de tipo selvagem na ausência de sobre-expressão e na presença de modificação pós-tradução do EGFR normal.

O presente invento refere-se a um membro de ligação específica, particularmente um anticorpo ou um seu fragmento, que reconhece um epítopo de EGFR que está presente em células que expressam EGFR amplificado ou expressam o EGFR de 2-7 e não detetável em células que expressam o EGFR normal ou de tipo selvagem, particularmente na presença de modificação pós-tradução normal.

Nota-se ainda e demonstra-se aqui que uma observação ou característica não limitante adicional dos anticorpos do presente invento é o seu reconhecimento do seu epítopo na presença de grupos ricos em manose, que é uma característica de glicosilação inicial ou de uma modificação simples dos hidratos de carbono. Assim, a glicosilação alterada ou aberrante facilita a presença e/ou o reconhecimento do epítopo do anticorpo ou compreende uma porção do epítopo do anticorpo.

A glicosilação inclui e engloba a modificação pós-tradução de proteínas, designadas glicoproteínas, através de adição de oligossacáridos. Os oligossacáridos são adicionados em locais de glicosilação em glicoproteínas, particularmente incluindo oligossacáridos ligados em N e oligossacáridos ligados em O. Os oligossacáridos ligados em N são adicionados a um resíduo de Asn, particularmente em que o resíduo de Asn está na sequência N-X-S/T, onde X não pode ser Pro nem Asp, e são os mais comuns encontrados em glicoproteínas. Na biossíntese das glicoproteínas ligadas em N, forma-se primeiro um oligossacárido de tipo rico em manose (geralmente constituído por dolícol, N-Acetylglucosamina, manose e glicose) no retículo endoplasmático (RE). As glicoproteínas do tipo rico em manose são então transportadas do RE para o Golgi, onde normalmente ocorre mais processamento e modificação dos oligossacáridos. Os oligossacáridos ligados em

O são adicionados ao grupo hidroxilo de resíduos Ser ou Thr. Nos oligossacáridos ligados em O, a N-Acetylglucosamina é primeiro transferida para o resíduo Ser ou Thr através de N-acetylglucosaminiltransferase no RE. A proteína move-se então para o Golgi onde ocorre mais modificação e alongamento da cadeia.

Num aspeto particular do presente invento e tal como afirmado acima, os presentes inventores determinaram novos anticorpos monoclonais, aqui exemplificados pelo anticorpo designado mAb 806 e o seu quimérico ch806, que reconhecem especificamente o EGFR de tipo selvagem amplificado e o EGFR de2-7, ligando-se contudo a um epítopo distinto do péptido de junção único da mutação EGFR de2-7. Os anticorpos do presente invento reconhecem especificamente EGFR sobre-expresso, incluindo EGFR amplificado e EGFR mutante (aqui exemplificado pela mutação de2-7), particularmente após modificação pós-tradução aberrante. Adicionalmente, ao mesmo tempo que o mAb 806 não reconhece o EGFR de tipo selvagem normal expresso à superfície celular de células de glioma, não se liga ao domínio extracelular do EGFR imobilizado à superfície de placas de ELISA, indicando um epítopo conformacional com aspetto de um polipéptido. Importantemente, o mAb 806 não se ligou significativamente a tecidos normais tais como fígado e pele, que expressam níveis de EGFR wt endógeno que são superiores aos da maioria dos outros tecidos normais, mas em que EGFR não é sobre-expresso ou amplificado. Assim, o mAb 806 demonstra uma nova e útil especificidade, reconhecendo EGFR de2-7 e EGFR amplificado, ao mesmo tempo que não reconhece o EGFR de tipo selvagem normal ou o péptido de junção único que é característico de EGFR de2-7.

Num aspeto preferido, o anticorpo é um que tem as características do anticorpo que os inventores identificaram e caracterizaram, em particular o reconhecimento de EGFR amplificado e EGFR de2-7. Num aspeto particularmente preferido o anticorpo é o mAb 806 ou seus fragmentos ativos. Noutro aspeto preferido o anticorpo do presente invento compreende as sequências de aminoácidos de VH e VL representadas na Figura 14 (SEQ ID NO:2) e Figura 15 (SEQ ID NO:4), respetivamente.

O epítopo do membro de ligação específica ou anticorpo está situado dentro da região compreendendo os resíduos 273-501 da sequência do EGFR normal maduro ou de tipo selvagem e assim as proteínas de ligação específica proporcionadas tais como anticorpos, ligam-se ao EGFR de2-7 num epítopo situado dentro da região compreendendo os resíduos 273-501 da sequência de EGFR. O epítopo pode ser determinado através de quaisquer técnicas de mapeamento de epítopos convencionais conhecidas dos peritos na especialidade. Alternativamente, a sequência de ADN codificando os resíduos 273-501 pode ser digerida e os fragmentos resultantes expressos num hospedeiro adequado. A ligação do anticorpo pode ser determinada tal como mencionado acima.

Em particular, o membro ligar-se-á a um epítopo compreendendo os resíduos 273-501 do EGFR maduro normal ou de tipo selvagem. No entanto, outros anticorpos que mostram o mesmo padrão de reatividade ou um substancialmente semelhante também formam um aspeto do presente invento. Isto pode ser determinado através da comparação de tais membros com um anticorpo compreendendo os domínios VH e VL mostrados em SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4, respetivamente. A comparação será tipicamente feita utilizando um *Western blot* em que os membros de ligação são ligados a membranas em duplicado preparadas a partir de uma preparação nuclear de células para que o padrão de ligação possa ser diretamente comparado.

Noutro aspeto, o presente invento proporciona um anticorpo capaz de competir com o anticorpo 806, sob condições nas quais pelo menos 10% de um anticorpo possuindo as sequências de VH e VL do anticorpo 806 são impedidos de se ligarem ao EGFR de2-7 através de competição com um tal anticorpo num ensaio de ELISA. Tal como exposto acima, anticorpos anti-idiotípicos estão contemplados e são aqui ilustrados.

Um polipeptídeo isolado consistindo essencialmente no epítopo compreendendo os resíduos 273-501 do EGFR maduro de tipo selvagem (resíduos 6-234 do EGFR de2-7 maduro) forma outro aspeto da presente divulgação. O péptido da divulgação é particularmente útil em ensaios ou estojos de diagnóstico e terapeuticamente ou profilaticamente, incluindo como uma

vacina antitumoral ou anticancerosa. Assim as composições do péptido incluem uma composição farmacêutica e composições imunogénicas.

Utilizações de Diagnóstico e Terapêuticas

A especificidade única dos membros de ligação específica, particularmente anticorpos ou seus fragmentos, do presente invento, que são tal como definido na reivindicação 1, proporciona utilizações de diagnóstico e terapêuticas para identificar, caracterizar, alvejar e tratar, reduzir ou eliminar vários tipos de células tumorigénicas e tipos de tumores, por exemplo tumores da cabeça e pescoço, da mama, do pulmão, da bexiga ou da próstata e glioma, sem os problemas associados à tomada pelos tecidos normais que pode ser observada com os anticorpos de EGFR anteriormente conhecidos. Assim, as células que sobre-expressam EGFR (p.ex., através de amplificação ou expressão de um EGFR mutante ou variante), particularmente aquelas demonstrando modificação pós-tradução aberrante podem ser reconhecidas, isoladas, caracterizadas, alvejadas e tratadas ou eliminadas utilizando o membro ou membros de ligação, particularmente anticorpo(s) ou seus fragmentos do presente invento.

Os anticorpos do presente invento podem assim categorizar especificamente a natureza dos tumores ou células tumorigénicas com EGFR, através de coloração ou de reconhecimento por outro modo dos tumores ou células em que está presente sobre-expressão de EGFR, particularmente amplificação e/ou mutação de EGFR, particularmente EGFR de2-7. Mais, os anticorpos do presente invento, tal como exemplificados pelo mAb 806 e o anticorpo quimérico ch806, demonstram uma significativa atividade antitumoral *in vivo* contra tumores contendo EGFR amplificado e contra xenoenxertos positivos para EGFR de2-7.

Tal como delineado acima, os inventores verificaram que o membro de ligação específica do presente invento reconhece formas associadas a tumores do EGFR (EGFR de2-7 e EGFR amplificado) mas não o recetor de tipo selvagem normal, quando expresso em células normais. Crê-se que o reconhecimento do anticorpo seja dependente de uma modificação pós-tradução

aberrante (p.ex., uma variante única de glicosilação, acetilação ou fosforilação) do EGFR expresso em células exibindo sobre-expressão do gene de EGFR.

Tal como descrito abaixo, mAb 806 e ch806 foram utilizados em estudos terapêuticos. Mostrou-se que mAb 806 e ch806 inibem o crescimento de xenoenxertos que sobre-expressam EGFR (p.ex., amplificado) e de xenoenxertos que expressam EGFR de2-7 humano de tumores humanos e induzem uma necrose significativa dentro de tais tumores.

Para além disso, os anticorpos do presente invento inibem o crescimento de tumores intracranianos num modelo preventivo. Este modelo envolve a injeção de células de glioma expressando EGFR de2-7 em ratinhos nus e depois a injeção do anticorpo intracranianamente no mesmo dia ou dentro de 1 a 3 dias, opcionalmente com doses repetidas. As doses de anticorpo são adequadamente de cerca de 10 µg. Os ratinhos injetados com anticorpo são comparados com controlos e verificou-se que a sobrevida dos ratinhos tratados é significativamente aumentada.

Por essa razão, noutro aspoto do presente invento, é proporcionado um membro de ligação específica do presente invento para utilizar num método de tratamento de um tumor, uma condição cancerosa, uma condição pré-cancerosa e qualquer condição relacionada ou resultante de crescimento celular hiperproliferativo.

Os anticorpos do presente invento são desenhados para serem utilizados em métodos de diagnóstico e tratamento de tumores em sujeitos humanos ou animais, particularmente tumores epiteliais. Estes tumores podem ser tumores sólidos primários ou secundários de qualquer tipo incluindo, mas não se limitando a, glioma, tumores da mama, do pulmão, da próstata, da cabeça ou pescoço.

Geração de Membros de Ligação e Anticorpos

A metodologia geral para preparar anticorpos monoclonais através de hibridomas é bem conhecida. Linhas celulares imortais produtoras de anticorpos podem também ser criadas

através de técnicas para além da fusão, tais como transformação direta de linfócitos B com ADN oncogénico ou transfecção com vírus de Epstein-Barr. Ver, p.ex., M. Schreier *et al.*, "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling *et al.*, "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett *et al.*, "Monoclonal Antibodies" (1980); ver também Patentes U.S. N.º 4341761; 4399121; 4427783; 4444887; 4451570; 4466917; 4472500; 4491632; 4493890.

Painéis de anticorpos monoclonais produzidos contra EGFR podem ser pesquisados quanto a várias propriedades; i.e., isotipo, epítopo, afinidade, etc. De particular interesse são anticorpos monoclonais que imitem a atividade de EGFR ou suas subunidades. Tais monoclonais podem ser prontamente identificados em ensaios de atividade do membro de ligação específica. Os anticorpos de elevada afinidade são também úteis quando é possível a purificação por imunoafinidade do membro de ligação específica nativo ou recombinante.

Os métodos para produção de anticorpos policlonais anti-EGFR são bem conhecidos na arte. Ver Patente U.S. N.º 4493795 para Nestor *et al.* Um anticorpo monoclonal, contendo tipicamente porções Fab e/ou F(ab')₂ de moléculas de anticorpo úteis, pode ser preparado utilizando a tecnologia de hibridoma descrita em "Antibodies-A Laboratory Manual", Harlow e Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988). Resumidamente, para formar o hibridoma a partir do qual é produzida a composição do anticorpo monoclonal, uma linha celular de mieloma ou outra que se auto-perpetue é fundida com linfócitos obtidos do baço de um mamífero hiperimunizado com um EGFR apropriado.

Os esplenócitos são tipicamente fundidos com células de mieloma utilizando polietilenoglicol (PEG) 6000. Os híbridos fundidos são selecionados através da sua sensibilidade a HAT. Os hibridomas produtores de um anticorpo monoclonal útil na prática deste invento são identificados através da sua capacidade para imunorreagir com o presente anticorpo ou membro de ligação e a sua capacidade para inibir a atividade tumorigénica ou hiperproliferativa especificada em células alvo.

Um anticorpo monoclonal útil na prática do presente invento pode ser produzido através do início de uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio de nutrientes contendo um hibridoma que segregá moléculas de anticorpo com a especificidade do antigénio apropriada. A cultura é mantida sob condições e durante um período de tempo suficiente para que o hibridoma segregue as moléculas de anticorpo para o meio. O meio contendo o anticorpo é então colhido. As moléculas de anticorpo podem então ser melhor isoladas através de técnicas bem conhecidas.

Os meios úteis para a preparação destas composições são ambos bem conhecidos na arte e estão comercialmente disponíveis e incluem meios de cultura sintéticos, ratinhos consanguíneos e semelhantes. Um meio sintético exemplar é o meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco *et al.*, *Virol.* 8: 396, 1959) suplementado com 4,5 mg/l de glicose, glutamina 20 mM e soro fetal de vitelo a 20%. Uma linhagem de ratinhos consanguíneos exemplar é a Balb/c.

Os métodos para a produção de anticorpos monoclonais anti-EGFR são também conhecidos na arte. Ver Niman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4949-4953, 1983. Tipicamente, o EGFR ou um análogo peptídico é utilizado sozinho ou conjugado com um transportador imunogénico, como imunogénio no procedimento descrito anteriormente para produção de anticorpos monoclonais anti-EGFR. Os hibridomas são pesquisados quanto à capacidade para produzir um anticorpo que imunorreage com o presente EGFR em células tumorigénicas, anormais ou hiperproliferativas. Outros anticorpos anti-EGFR incluem mas não se limitam ao anticorpo HuMAX-EGFR de Genmab/Medarex, o anticorpo 108 (ATCC HB9764) e Patente U.S. N.º 6217866 e anticorpo 14E1 de Schering AG (Patente U.S. N.º 5942602).

Membros de Ligação Recombinantes, Quiméricos, Biespecíficos e Fragmentos

Em geral, as regiões CDR3, compreendendo as sequências de aminoácidos substancialmente tal como expostas como as regiões CDR3 de SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4 estarão suportadas numa estrutura que permite a ligação das regiões CDR3 a um

antigénio tumoral. No caso da região CDR3 de SEQ ID NO:4, esta é de preferência suportada pela região VL de SEQ ID NO:4.

Por "substancialmente tal como exposto" entenda-se que as regiões CDR3 do presente invento serão idênticas ou altamente homólogas às regiões especificadas de SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4. Por "altamente homólogas" está contemplado que apenas algumas poucas substituições, de preferência de 1 a 8, de preferência de 1 a 5, de preferência de 1 a 4 ou de 1 a 3 ou 1 ou 2 substituições podem ser feitas nas CDR.

A estrutura para suportar as CDR3 do presente invento será geralmente de uma sequência de cadeia pesada ou leve de anticorpo ou uma porção substancial desta na qual as regiões CDR3 estão situadas em localizações correspondentes à região CDR3 dos domínios variáveis VH e VL do anticorpo de ocorrência natural codificados por genes de imunoglobulina rearranjados. As estruturas e localizações dos domínios variáveis de imunoglobulina podem ser determinados através de referência a Kabat, E.A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4^a Edição, US Department of Health and Human Services, 1987 e suas atualizações, agora disponíveis na Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>)).

De preferência, a sequência de aminoácidos substancialmente tal como exposta como resíduos 115-123 de SEQ ID NO:2 é suportada como a CDR3 num domínio variável da cadeia pesada humana ou uma sua porção substancial e as sequências de aminoácidos substancialmente tal como expostas como resíduos 44-54, 70-76 e 109-117 de SEQ ID NO:4 são suportadas como as CDR 1-3 respetivamente num domínio variável da cadeia leve humana ou uma sua porção substancial.

Os domínios variáveis podem ser derivados de qualquer linha germinativa ou domínio variável humano rearranjado ou podem ser um domínio variável sintético baseado em sequências de consenso de domínios variáveis humanos conhecidos. As sequências derivadas de CDR3 do presente invento, tal como definidas no parágrafo anterior, podem ser introduzidas num repertório de domínios variáveis sem regiões CDR3, utilizando tecnologia de ADN recombinante.

Por exemplo, Marks *et al.* (*Bio/Technology* 10: 779-783, 1992) descrevem métodos de produção de repertórios de domínios variáveis de anticorpo em que os iniciadores de consenso dirigidos contra ou adjacentes à extremidade 5' da área do domínio variável são utilizados em conjunto com iniciadores de consenso para a terceira região estrutural dos genes de VH humanos para proporcionar um repertório de domínios variáveis de VH sem uma CDR3. Marks *et al.* descrevem ainda como este repertório pode ser combinado com uma CDR3 de um determinado anticorpo. Utilizando técnicas análogas, as sequências derivadas de CDR3 do presente invento podem ser baralhadas com repertórios de domínios VH ou VL sem uma CDR3 e os domínios VH ou VL completos baralhados combinados com um domínio cognato VL ou VH para proporcionar os membros de ligação específica do presente invento. O repertório pode então ser apresentado num sistema hospedeiro adequado tal como o sistema de apresentação fágica de WO 92/01047 para que possam ser selecionados membros de ligação específica adequados. Um repertório pode consistir em qualquer quantidade acima de 10^4 membros individuais, por exemplo de 10^6 a 10^8 ou 10^{10} membros.

Técnicas análogas de baralhamento ou combinatórias são também divulgadas por Stemmer (*Nature* 370: 389-391, 1994), que descrevem a técnica em relação a um gene da -lactamase mas observam que a abordagem pode ser utilizada para a criação de anticorpos.

Outra alternativa é gerar novas regiões VH ou VL possuindo as sequências derivadas de CDR3 do presente invento utilizando mutagénese aleatória, por exemplo, dos genes de VH ou VL de mAb806 para gerar mutações dentro de todo o domínio variável. Uma tal técnica é descrita por Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580, 1992, que utilizaram PCR tendente ao erro.

Outro método que pode ser utilizado é o de dirigir mutagénese a regiões CDR dos genes de VH ou VL. Tais técnicas são divulgadas por Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813, 1994 e Schier *et al.*, *J. Mol. Biol.* 263: 551-567, 1996.

Todas as técnicas descritas acima são conhecidas como tal na arte e em si não fazem parte do presente invento. O perito na especialidade será capaz de utilizar tais técnicas para proporcionar membros de ligação específica do presente invento utilizando metodologia de rotina na arte.

Uma porção substancial de um domínio variável de imunoglobulina compreenderá pelo menos as três regiões CDR, juntamente com as suas regiões estruturais intervenientes. De preferência, a porção incluirá também pelo menos cerca de 50% da primeira e/ou da quarta região estrutural, sendo os 50% os 50% C-terminais da primeira região estrutural e os 50% N-terminais da quarta região estrutural. Resíduos adicionais na extremidade N-terminal ou C-terminal da parte substancial do domínio variável podem ser os que não estão normalmente associados a regiões do domínio variável de ocorrência natural. Por exemplo, a construção de membros de ligação específica do presente invento feita através de técnicas de ADN recombinante pode resultar na introdução de resíduos N-terminais ou C-terminais codificados por ligantes introduzidos para facilitar a clonagem ou outros passos de manipulação. Outros passos de manipulação incluem a introdução de ligantes para unir domínios variáveis do presente invento a mais sequências proteicas incluindo cadeias pesadas de imunoglobulina, outros domínios variáveis (por exemplo na produção de diacorpos) ou etiquetas proteicas tal como discutido em mais detalhe abaixo.

Embora num aspeto preferido do presente invento sejam preferidos membros de ligação específica compreendendo um par de domínios de ligação em sequências substancialmente expostas em SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4, domínios de ligação simples baseados numa destas sequências formam outros aspetos do presente invento. No caso dos domínios de ligação baseados na sequência substancialmente exposta em SEQ ID NO:2, tais domínios de ligação podem ser utilizados como agentes de direcionamento para抗igénios tumorais uma vez que se sabe que domínios VH de imunoglobulina são capazes de se ligar a抗igénios alvo de um modo específico.

No caso de cada um dos domínios de ligação específica de cadeia simples, estes domínios podem ser utilizados para

pesquisar domínios complementares capazes de formar um membro de ligação específica de dois domínios que tenha propriedades *in vivo* tão boas ou iguais às do anticorpo mAb806 aqui divulgado.

Isto pode ser alcançado através de métodos de pesquisa de apresentação fágica utilizando a designada abordagem combinatória hierárquica dupla tal como divulgado na Patente U.S. N.º 5969108 na qual uma colónia individual contendo um clone da cadeia H ou L é utilizada para infetar uma biblioteca completa de clones codificando a outra cadeia (L ou H) e o membro de ligação específica de duas cadeias resultante é selecionado de acordo com técnicas de apresentação fágica tais como as descritas nessa referência. Esta técnica é também divulgada em Marks *et al.*, *ibid.*

Os membros de ligação específica do presente invento podem ainda compreender regiões constantes de anticorpo ou partes destas. Por exemplo, membros de ligação específica baseados em SEQ ID NO:4 podem ser unidos na sua extremidade C-terminal a domínios constantes da cadeia leve de anticorpos incluindo as cadeias C ou C humanas, de preferência cadeias C. Semelhantemente, membros de ligão específica baseados em SEQ ID NO:2 podem ser unidos na sua extremidade C-terminal a toda ou a parte de uma cadeia pesada de imunoglobulina derivada de qualquer isotipo de anticorpo, p.ex., IgG, IgA, IgE, IgD e IgM e qualquer uma das subclasses de isotipo, particularmente IgG1, IgG2b e IgG4. É preferida a IgG1.

O advento da tecnologia de anticorpos monoclonais (mAb) há 25 anos proporcionou um enorme repertório de reagentes de investigação úteis e criou a oportunidade de utilizar anticorpos como reagentes farmacêuticos aprovados em terapia do cancro, distúrbios auto-imunes, rejeição de transplantes, profilaxia antiviral e como antitrombóticos (Glennie e Johnson, 2000). A aplicação da engenharia molecular para converter mAb de murídeo em mAb quiméricos (região V de ratinho, região C humana) e reagentes humanizados onde apenas as regiões determinantes de complementaridade dos mAb (CDR) são de origem em murídeo foi crítica para o sucesso clínico da terapia com mAb. Os mAb desenhados reduziram marcadamente a imunogenicidade ou tornaram-na ausente, aumentaram a semivida

sérica e a porção Fc humana do mAb aumenta o potencial de recrutamento de efetores imunitários do complemento e de células citotóxicas (Clark, 2000). Investigações sobre a biodistribuição, farmacocinética e qualquer indução de uma resposta imunitária aos mAb administrados clinicamente requerem o desenvolvimento de análises para discriminar entre as proteínas farmacêuticas e endógenas.

Os anticorpos, ou quaisquer seus fragmentos, podem também ser conjugados ou fundidos de forma recombinante com qualquer toxina celular, bacteriana ou outra, p.ex., exotoxina de *Pseudomonas*, rícino ou toxina da difteria. A parte da toxina utilizada pode ser a toxina inteira ou qualquer domínio particular da toxina. Tais moléculas anticorpo-toxina foram utilizadas com sucesso para direcionamento e terapia de diferentes tipos de cancros, ver p.ex., Pastan, *Biochim Biophys Acta.*, 24 de Out. de 1997, 1333(2): C1-6; Kreitman et al., *N. Engl. J. Med.* 345(4): 241-7, 26 de Jul. de 2001; Schnell et al., *Leukemia* 14(1): 129-35, Jan. de 2000; Ghetie et al., *Mol Biotechnol.* 18(3): 251-68, Jul. de 2001.

Podem ser formados multímeros biespecíficos e triespecíficos através da associação de diferentes moléculas scFv e foram desenhados como reagentes reticulados para recrutamento de células T para tumores (imunoterapia), redirecccionamento viral (terapia génica) e como reagentes de aglutinação de glóbulos vermelhos (imunodiagnóstico), ver p.ex., Todorovska et al., *J. Immunol. Methods.* 248(1-2): 47-66, 1 de Fev. de 2001; Tomlinson et al., *Methods Enzymol.* 326: 461-79, 2000; McCall et al., *J. Immunol.* 166(10): 6112-7, 15 de Maio de 2001.

Anticorpos completamente humanos podem ser preparados através de imunização de ratinhos transgénicos possuindo grandes porções das cadeias pesadas e leves da imunoglobulina humana. Estes ratinhos, cujos exemplos são o Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) (Patentes U.S. N.º 6075181 e 6150584), o HuMAb-Mouse™ (Medarex, Inc./GenPharm) (Patentes U.S. N.º 5545806 e 5569825), o TransChromo Mouse™ (Kirin) e o KM Mouse™ (Medarex/Kirin), são bem conhecidos na arte. Os anticorpos podem então ser preparados através, p.ex., da técnica de hibridoma padrão ou através de apresentação fágica.

Estes anticorpos conterão então apenas sequências de aminoácidos completamente humanas.

Anticorpos completamente humanos podem também ser gerados utilizando apresentação fágica a partir de bibliotecas humanas. A apresentação fágica pode ser efetuada utilizando métodos bem conhecidos dos peritos na especialidade, tal como em Hoogenboom *et al.* e Marks *et al.* (Hoogenboom H.R. e Winter G. *J. Mol. Biol.* 227(2): 381-8, 1992; Marks, J.D. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222(3): 581-97, 1991; e também Patentes U.S. N°s 5885793 e 5969108).

Anticorpos Terapêuticos e Utilizações

As propriedades *in vivo*, particularmente em relação à razão tumor:sangue e velocidade de eliminação, dos membros de ligação específica do presente invento serão pelo menos comparáveis com as de mAb806. Após administração a um sujeito humano ou animal um tal membro de ligação específica mostrará um pico na razão tumor para sangue de >1:1. De preferência a uma tal razão o membro de ligação específica terá também uma razão de tumor para órgão de mais de 1:1, de preferência mais de 2:1, de maior preferência mais de 5:1. De preferência a uma tal razão o membro de ligação específica terá também uma razão de órgão para sangue de <1:1 em órgãos fora do local do tumor. Estas razões excluem órgãos de catabolismo e secreção do membro de ligação específica administrado. Assim no caso dos scFv e dos Fab (tal como mostrado nos exemplos acompanhantes), os membros de ligação são segregados através dos rins e há uma maior presença aqui que outros órgãos. No caso das IgG inteiras, a eliminação será pelo menos em parte, através do fígado. O pico da razão de localização do anticorpo intacto será normalmente alcançado entre 10 e 200 horas após a administração do membro de ligação específica. Mais particularmente, a razão pode ser medida num xenoenxerto tumoral de cerca de 0,2-1,0 g formado subcutaneamente num flanco de um ratinho nu atílico.

Os anticorpos do presente invento podem ser marcados com um marcador detetável ou funcional. Marcadores detetáveis incluem, mas não se limitam a, radiomarcadores tais como os isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I ,

^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc e ^{186}Re , que podem ser unidos aos anticorpos do presente invento utilizando química convencional conhecida na arte de imagiologia de anticorpos. Os marcadores incluem também marcadores fluorescentes e marcadores utilizados convencionalmente na arte para imagiologia MRI-CT. Podem também incluir marcadores enzimáticos tais como peroxidase de rábano. Os marcadores incluem ainda porções químicas tais como biotina que podem ser detetadas através de ligação a uma porção cognata específica detetável, p.ex., avidina marcada.

Marcadores funcionais incluem substâncias que são concebidas para se dirigirem ao local de um tumor para causar destruição do tecido tumoral. Tais marcadores funcionais incluem fármacos citotóxicos tais como 5-fluorouracilo ou rícino e enzimas tais como carboxipeptidases bacterianas ou nitro-redutase, que são capazes de converter pró-fármacos em fármacos ativos no local de um tumor.

Também, anticorpos incluindo anticorpos policlonais e anticorpos monoclonais e fármacos que modulam a produção ou atividade dos membros de ligação específica, anticorpos e/ou suas subunidades podem possuir certas aplicações de diagnóstico e podem, por exemplo, ser utilizados para o fim de detetar e/ou medir condições tais como cancro, lesões pré-cancerosas, condições relacionadas ou resultantes de crescimento celular hiperproliferativo ou semelhantes. Por exemplo, os membros de ligação específica, anticorpos ou suas subunidades podem ser utilizados para produzir anticorpos policlonais e monoclonais para si mesmos numa variedade de meios celulares, através de técnicas conhecidas tais como a técnica de hibridoma utilizando, por exemplo, linfócitos de baço de ratinho fundidos e células de mieloma. Igualmente, moléculas pequenas que imitem ou antagonizem a atividade ou atividades dos membros de ligação específica do presente invento podem ser descobertas ou sintetizadas e podem ser utilizadas em protocolos de diagnóstico e/ou terapia.

Os membros de ligação específica radiomarcados, particularmente anticorpos e seus fragmentos, são úteis em técnicas de diagnóstico *in vitro* e em técnicas de radioimagiologia *in vivo* e em radioimunoterapia. No caso de

imagiologia *in vivo*, os membros de ligação específica do presente invento podem ser conjugados com um agente de imagiologia em vez de um ou mais radioisótopos, incluindo mas não se limitando a um agente de melhoramento de imagem de ressonância magnética, em que por exemplo uma molécula de anticorpo é carregada com um grande número de iões paramagnéticos através de grupos quelantes. Exemplos de grupos quelantes incluem EDTA, porfirinas, poliaminas, éteres de coroa e polioximas. Exemplos de iões paramagnéticos incluem gadolínio, ferro, manganês, rénio, európio, lantânio, hólmio e férmito. Noutro aspeto do presente invento, os membros de ligação específica radiomarcados, particularmente anticorpos e seus fragmentos, particularmente radioimunoconjogados, são úteis em radioimunoterapia, particularmente como anticorpos radiomarcados para terapia de cancro. Ainda noutro aspeto, os membros de ligação específica radiomarcados, particularmente anticorpos e seus fragmentos, são úteis em técnicas de cirurgia radioimuno-orientadas, em que podem identificar e indicar a presença e/ou localização de células de cancro, células pré-cancerosas, células tumorais e células hiperproliferativas, antes, durante ou após cirurgia para remover tais células.

Os imunoconjogados ou proteínas de fusão de anticorpos do presente invento, em que os membros de ligação específica, particularmente anticorpos e seus fragmentos, do presente invento são conjugados ou unidos a outras moléculas ou agentes incluem ainda, mas não se limitam a, membros de ligação conjugados com um agente de ablação química, toxina, imunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapêutico ou fármaco.

Radioimunoterapia (RAIT) entrou na clínica e demonstrou eficácia utilizando vários anticorpos imunoconjogados. O anticorpo anti-antigénio carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado marcado com ^{131}I , hMN-14, foi avaliado em cancro colorrectal (Behr, T.M. et al., *Cancer* 94(Supl. 4): 1373-81, 2002) e o mesmo anticorpo com marcador ^{90}Y foi avaliado em carcinoma medular da tiroide (Stein, R. et al., *Cancer* 94(1): 51-61, 2002). Radioimunoterapia utilizando anticorpos monoclonais foi também avaliada e relatada para linfoma não de Hodgkin e cancro pancreático (Goldenberg, D.M., *Crit. Rev.*

Oncol. Hematol. 39(1-2): 195-201, 2001; Gold, D.V. et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39(1-2): 147-54, 2001). Os métodos de radioimunoterapia com anticorpos particulares são também descritos nas Patentes U.S. 6306393 e 6331175. A cirurgia radioimuno-orientada (RIGS) entrou também na clínica e demonstrou eficácia e utilidade, incluindo a utilização de anticorpos anti-CEA e anticorpos direcionados contra抗igénios associados a tumores (Kim, J.C. et al., *Int. J. Cancer* 97(4): 542-7, 2002; Schneebaum, S. et al., *World J. Surg.* 25(12): 1495-8, 2001; Avital, S. et al., *Cancer* 89(8): 1692-8, 2000; McIntosh, D.G. et al., *Cancer Biother. Radiopharm.* 12(4): 287-94, 1997).

Os anticorpos do presente invento podem ser administrados a um paciente a necessitar do tratamento através de qualquer via adequada, habitualmente através de injeção na corrente sanguínea ou LCR ou diretamente no local do tumor. A dose exata dependerá de vários fatores, incluindo de se o anticorpo é para diagnóstico ou para tratamento, o tamanho e a localização do tumor, a natureza exata do anticorpo (se é um anticorpo inteiro, fragmento, diacorpo, etc.) e a natureza do marcador detetável ou funcional unido ao anticorpo. Quando é utilizado um radionuclídeo para terapia, uma dose única máxima adequada é de cerca de 45 mCi/m², até um máximo de cerca de 250 mCi/m². A dosagem preferível está no intervalo de 15 a 40 mCi, com um intervalo de dosagem mais preferido de 20 a 30 mCi ou 10 a 30 mCi. Tal terapia pode requerer substituição da medula óssea ou de células estaminais. Uma dose típica de anticorpo para imagiologia de tumores ou tratamento de tumores estará no intervalo de 0,5 a 40 mg, de preferência de 1 a 4 mg de anticorpo na forma F(ab')2. Os anticorpos nus são de preferência administrados em doses de 20 a 1000 mg de proteína por dose ou 20 a 500 mg de proteína por dose ou 20 a 100 mg de proteína por dose. Esta é uma dose para um único tratamento de um paciente adulto, que pode ser proporcionalmente ajustada para crianças e bebés e também ajustada para outros formatos de anticorpo em proporção ao peso molecular. Os tratamentos podem ser repetidos a intervalos diários, duas vezes por semana, semanais ou mensais, à discrição do médico.

Estas formulações podem incluir uma segunda proteína de ligação, tal como as proteínas de ligação a EGFR descritas

supra. Numa forma especialmente preferida, esta segunda proteína de ligação é um anticorpo monoclonal tal como 528 ou 225, discutido *infra*.

Composições Farmacêuticas e Terapêuticas

Os membros de ligação específica do presente invento serão habitualmente administrados na forma de uma composição farmacêutica, que pode compreender pelo menos um componente para além do membro de ligação específica.

Assim, as composições farmacêuticas de acordo com o presente invento, e para utilizar de acordo com o presente invento, podem compreender, para além do ingrediente ativo, um excipiente, transportador, tampão, estabilizador ou outros materiais farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos dos peritos na especialidade. Tais materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A exata natureza do transportador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral ou através de injeção, p.ex., intravenosa.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode compreender um transportador sólido tal como gelatina ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas compreendem geralmente um transportador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluída uma solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacáridos ou glicóis tal como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa ou injeção no local de aflição, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável que é apirogénica e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os peritos na especialidade são bem capazes de preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotónicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Solução de Ringer, Injeção de Solução de Ringer Lactada. Podem ser incluídos conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos, conforme necessário.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, terapêuticos ou agentes, simultaneamente ou sequencialmente dependendo da condição a tratar. Adicionalmente, o presente invento contempla e inclui composições compreendendo o membro de ligação, particularmente anticorpo ou seu fragmento, aqui descrito e outros agentes ou terapêuticos tais como agentes ou terapêuticos anticancerosos, hormonas, agentes anti-EGFR ou anticorpos, ou moduladores imunitários. Mais geralmente estes agentes anticancerosos podem ser inibidores de tirosina-quinases ou inibidores de cascadas de fosforilação, moduladores pós-tradução, inibidores do crescimento ou divisão celular (p.ex., antimitóticos) ou inibidores da transdução de sinal. Outros tratamentos ou terapêuticos podem incluir a administração de doses adequadas de fármacos analgésicos tais como fármacos anti-inflamatórios não esteróides (p.ex., aspirina, paracetamol, ibuprofeno ou cetoprofeno) ou opiáceos tais como morfina ou antieméticos. A composição pode ser administrada em combinação (sequencialmente (i.e. antes ou depois) ou simultaneamente) com inibidores de tirosina-quinases (incluindo, mas não se limitando a AG1478 e ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorrubicina, temozolomida, cisplatina, carboplatina, nitrosureias, procarbazina, vincristina, hidroxiureia, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, lomustina e/ou outros agentes quimioterapêuticos. Assim, estes agentes podem ser agentes específicos anti-EGFR ou inibidores de tirosina-quinases tais como AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774 ou SU-6668 ou podem ser agentes anticancerosos e antineoplásicos mais gerais tais como doxorrubicina, cisplatina, temozolomida, nitrosureias, procarbazina, vincristina, hidroxiureia, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina ou lomustina. Adicionalmente, a composição pode ser administrada com hormonas tais como dexametasona, moduladores imunitários, tais como interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF) ou outros fatores de crescimento ou citoquinas que estimulam a resposta imunitária e a redução ou eliminação de células de cancro ou tumores. Um modulador imunitário tal como TNF pode ser combinado juntamente com um membro do presente invento na forma de um anticorpo biespecífico reconhecendo o epítopo de EGFR 806 bem como ligando-se a receptores de TNF. A composição pode também ser administrada com, ou pode incluir,

combinações juntamente com outros anticorpos anti-EGFR, incluindo mas não se limitando aos anticorpos anti-EGFR 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 e ABX-EGF.

Anteriormente a utilização de agentes tais como doxorrubicina e cisplatina em conjunto com anticorpos anti-EGFR produziu maior atividade antitumoral (Fan *et al.*, 1993; Baselga *et al.*, 1993). A combinação de doxorrubicina e mAb 528 resultou na erradicação total de xenoenxertos A431 estabelecidos, enquanto o tratamento com agente sozinho causou apenas uma inibição temporária do crescimento *in vivo* (Baselga *et al.*, 1993). Igualmente, a combinação de cisplatina e mAb 528 ou 225 também conduziu a erradicação de xenoenxertos A431 bem estabelecidos, que não foi observada quando foi utilizado o tratamento com um dos agentes (Fan *et al.*, 1993).

Radioterapia Convencional

Adicionalmente, o presente invento contempla e inclui composições terapêuticas para utilização do membro de ligação em combinação com radioterapia convencional. Foi indicado que o tratamento com anticorpos direcionados a receptores de EGF pode aumentar os efeitos da radioterapia convencional (Milas *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 6(2): 701-8, Fev. de 2000, Huang *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6(6): 2166-74, Jun. de 2000).

Tal como aqui demonstrado, combinações do membro de ligação do presente invento, particularmente um anticorpo ou seu fragmento, de preferência o mAb806, ch806 ou um seu fragmento, e produtos terapêuticos anticâncerosos, particularmente produtos terapêuticos anti-EGFR, incluindo outros anticorpos anti-EGFR, demonstram terapia eficaz e particularmente sinergia contra tumores xenoenxertados. Nos exemplos, está demonstrado que a combinação de AG1478 e mAb 806 resulta numa redução significativamente maior do volume do tumor do xenoenxerto A431 em comparação com o tratamento com um dos agentes sozinho. AG1478 (4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) é um potente e seletivo inibidor do receptor-quinase de EGF e é particularmente descrito na Patente dos Estados Unidos N.º 5457105, (ver também, Liu, W. *et al.*, *J. Cell Sci.* 112: 2409, 1999; Eguchi, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 8890, 1998; Levitsky, A. e

Gazit, A., *Science* 267: 1782, 1995). Os exemplos do fascículo demonstram ainda sinergia terapêutica do anticorpo 806 com outros anticorpos anti-EGFR, particularmente com o anticorpo anti-EGFR, 528.

O presente invento contempla ainda composições terapêuticas úteis na prática dos métodos terapêuticos desta divulgação. Uma composição terapêutica sujeita inclui, em mistura, um excipiente (transportador) farmaceuticamente aceitável e um ou mais membros de ligação específica, polipéptido seu análogo ou seu fragmento, tal como aqui descrito como ingrediente ativo. Numa concretização preferida, a composição compreende um antigénio capaz de modular a ligação específica do presente membro de ligação/anticorpo com uma célula alvo.

A preparação de composições terapêuticas que contêm polipéptidos, análogos ou fragmentos ativos como ingredientes ativos é bem entendida na arte. Tipicamente, tais composições são preparadas como injetáveis, como soluções ou suspensões líquidas. No entanto, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção podem também ser preparadas. A preparação pode também ser emulsionada. O ingrediente ativo terapêutico é frequentemente misturado com excipientes que são farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes adequados são, por exemplo, água, soluções salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Adicionalmente, se desejado, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes de tamponamento do pH que aumentem a eficácia do ingrediente ativo.

Um polipéptido, análogo ou fragmento ativo pode ser formulado na composição terapêutica como formas salinas neutralizadas farmaceuticamente aceitáveis. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida, (formados com os grupos amino livres do polipéptido ou da molécula de anticorpo) e os que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico ou ácidos orgânicos tais como acético, oxálico, tartárico, mandélico e semelhantes. Os sais formados a partir

dos grupos carboxilo livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou ferro, e de bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaina e semelhantes.

As composições terapêuticas contendo o polipeptído, o análogo ou o fragmento ativo são convencionalmente administradas intravenosamente tal como através de injeção de, por exemplo, uma dose unitária. O termo "dose unitária" quando utilizado em relação a uma composição terapêutica do presente invento refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagem unitária para seres humanos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente requerido; i.e., transportador ou veículo.

As composições são administradas de um modo compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a administrar depende do sujeito a tratar, da capacidade do sistema imunitário do sujeito para utilizar o ingrediente ativo e do grau desejado da capacidade de ligação a EGFR. As quantidades exatas de ingrediente ativo que é necessário administrar dependem da avaliação do praticante e são peculiares de cada indivíduo. No entanto, as dosagens adequadas podem variar de cerca de 0,1 a 20, de preferência cerca de 0,5 a cerca de 10 e de maior preferência de um a vários miligramas de ingrediente ativo por quilograma de peso corporal do indivíduo por dia e dependem da via de administração. Os regímenes adequados para administração inicial e injeções de reforço são também variáveis, mas são tipificados por uma administração inicial seguida de doses repetidas a intervalos de uma hora ou mais através de uma injeção subsequente ou outra administração. Alternativamente, está contemplada infusão intravenosa contínua suficiente para manter concentrações de dez nanomolar a dez micromolar no sangue.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode compreender um transportador sólido tal como

gelatina ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas compreendem geralmente um transportador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluída uma solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacáridos ou glicóis tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa ou injeção no local de aflição, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável que seja apirogénica e tenha pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os peritos na especialidade são perfeitamente capazes de preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotónicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Solução de Ringer, Injeção de Solução de Ringer Lactada. Podem ser incluídos conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos, conforme necessário.

Ensaios de Diagnóstico

O presente invento refere-se também a uma variedade de aplicações de diagnóstico, incluindo métodos para deteção da presença de estímulos tais como EGFR expresso de forma aberrante, em referência à sua capacidade para ser reconhecido pelo presente membro de ligação específica. Tal como mencionado anteriormente, o EGFR pode ser utilizado para produzir anticorpos para si próprio através de uma variedade de técnicas conhecidas e tais anticorpos podem então ser isolados e utilizados como em testes quanto à presença de determinada atividade de EGFR em células alvo suspeitas.

As aplicações de diagnóstico dos membros de ligação específica do presente invento, particularmente anticorpos e seus fragmentos, incluem aplicações *in vitro* e *in vivo* bem conhecidas e padrão para os peritos e baseadas na presente descrição. Os ensaios de diagnóstico e estojos para determinação *in vitro* e avaliação do *status* de EGFR, particularmente em relação à expressão aberrante de EGFR, podem ser utilizados para diagnosticar, avaliar e monitorizar amostras de pacientes incluindo as que se sabe ou suspeita de terem cancro, uma condição pré-cancerosa, uma condição relacionada com crescimento celular hiperproliferativo ou de

uma amostra tumoral. A determinação e avaliação do *status* de EGFR é também útil na determinação da adequação de um paciente para um ensaio clínico de um fármaco ou para a administração de um determinado agente quimioterapêutico ou membro de ligação específica, particularmente um anticorpo, do presente invento, incluindo suas combinações, *versus* um agente ou membro de ligação diferente. Este tipo de monitorização e determinação de diagnóstico está já em prática utilizando anticorpos contra a proteína HER2 no cancro da mama (Hercep Test, Dako Corporation), onde o ensaio é também utilizado para avaliar pacientes para terapia de anticorpos utilizando Herceptin. As aplicações *in vivo* incluem imagiologia de tumores ou determinação do *status* do cancro de indivíduos, incluindo radioimagiologia.

Tal como sugerido anteriormente, o método de diagnóstico da presente divulgação compreende o exame de uma amostra celular ou meio através de um ensaio incluindo uma quantidade eficaz de um antagonista para um EGFR/proteína, tal como um anticorpo anti-EGFR, de preferência um anticorpo policlonal purificado por afinidade e de maior preferência um mAb. Adicionalmente, é preferível que as moléculas de anticorpo anti-EGFR aqui utilizadas estejam na forma de porções Fab, Fab', F(ab')₂ ou F(v) ou de moléculas de anticorpo inteiras. Tal como anteriormente discutido, os pacientes capazes de beneficiar deste método incluem aqueles sofrendo de cancro, uma lesão pré-cancerosa, uma infecção viral, patologias envolvendo ou resultantes de crescimento celular hiperproliferativo ou outros desequilíbrios patológicos semelhantes. Os métodos para isolamento de EGFR e indução de anticorpos anti-EGFR e para determinação e otimização da capacidade de anticorpos anti-EGFR para auxiliar o exame de células alvo são todos bem conhecidos na arte.

De preferência, o anticorpo anti-EGFR utilizado nos métodos de diagnóstico desta divulgação é um anticorpo policlonal purificado por afinidade. De maior preferência, o anticorpo é um anticorpo monoclonal (mAb). Adicionalmente, as moléculas de anticorpo anti-EGFR aqui utilizadas podem estar na forma de porções Fab, Fab', F(ab')₂ ou F(v) das moléculas de anticorpo inteiras.

Tal como descrito em detalhe acima, o anticorpo ou anticorpos para o EGFR podem ser produzidos e isolados através de métodos padrão incluindo as técnicas de hibridoma bem conhecidas. Por conveniência, o anticorpo ou anticorpos para o EGFR serão aqui referidos como Ab_1 e o anticorpo ou anticorpos criados noutras espécies como Ab_2 .

A presença de EGFR em células pode ser avaliada através dos habituais procedimentos imunológicos *in vitro* ou *in vivo* aplicáveis a tais determinações. São conhecidos vários procedimentos úteis. Três desses procedimentos que são especialmente úteis utilizam o EGFR marcado com um marcador detetável, anticorpo Ab_1 marcado com um marcador detetável ou anticorpo Ab_2 marcado com um marcador detetável. Os procedimentos podem ser resumidos pelas seguintes equações em que o asterisco indica que a partícula está marcada e "R" representa o EGFR:

- A. $R^* + Ab_1 = R^*Ab_1$
- B. $R + Ab_1^* = RAb_1^*$
- C. $R + Ab_1 + Ab_2^* = RAb_1Ab_2^*$

Os procedimentos e a sua aplicação são todos familiares aos peritos na especialidade e podem ser assim utilizados dentro do âmbito do presente invento. O procedimento "competitivo", Procedimento A, é descrito nas Patentes U.S. N.º 3654090 e 3850752. Procedimento C, o procedimento em "sanduíche", é descrito nas Patentes U.S. N.º RE 31006 e 4016043. Ainda são conhecidos outros procedimentos tais como o procedimento de "duplo anticorpo" ou "DASP".

Em cada caso acima, o EGFR forma complexos com um ou mais anticorpos ou parceiros de ligação e um membro do complexo é marcado com um marcador detetável. O facto de se ter formado um complexo e, se desejado, a sua quantidade, podem ser determinados através de métodos conhecidos aplicáveis à deteção de marcadores.

Observar-se-á a partir do de cima que uma propriedade característica de Ab_2 é que reagirá com Ab_1 . Isto é porque Ab_1 criado numa espécie de mamífero foi utilizado noutra espécie como antigénio para criar o anticorpo Ab_2 . Por exemplo, Ab_2

pode ser criado em cabras utilizando anticorpos de coelho como antigénios. Ab_2 será por essa razão um anticorpo anti-coelho criado em cabras. Para os fins desta descrição e reivindicações, Ab_1 será referido como um anticorpo primário ou anti-EGFR e Ab_2 será referido como um anticorpo secundário ou anti- Ab_1 .

Os marcadores mais vulgarmente empregues para estes estudos são elementos radioativos, enzimas, químicos que fluorescem quando expostos a luz ultravioleta e outros. Vários materiais fluorescentes são conhecidos e podem ser utilizados como marcadores. Estes incluem, por exemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Texas Red, azul AMCA e Lucifer Yellow. Um material de deteção particular é um anticorpo anti-coelho preparado em cabras e conjugado com fluoresceína através de um isotiocianato.

O EGFR ou seu ou seus parceiros de ligação tais como o presente membro de ligação específica, podem também ser marcados com um elemento radioativo ou com uma enzima. O marcador radioativo pode ser detetado através de quaisquer procedimentos de contagem atualmente disponíveis. O isótopo preferido pode ser selecionado a partir de 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc e ^{186}Re .

Marcadores enzimáticos são de igual modo úteis e podem ser detetados através de qualquer uma das técnicas colorimétricas, espetrofotométricas, fluoroespetrofotométricas, amperimétricas ou gasométricas atualmente utilizadas. A enzima é conjugada com a partícula selecionada através de reação com moléculas de ponte tais como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldeído e semelhantes. Muitas enzimas que podem ser utilizadas nestes procedimentos são conhecidas e podem ser utilizadas. As preferidas são peroxidase, -glucuronidase, -D-glucosidase, -D-galactosidase, urease, glicose-oxidase mais peroxidase e fosfatase alcalina. As Patentes U.S. N.º 3654090; 3850752; e 4016043 são referidas por meio de exemplo para a sua divulgação de material e métodos de marcação alternativos.

-D-

Um sistema de ensaio particular que pode ser vantajosamente utilizado de acordo com o presente invento, é conhecido como um ensaio de recetor. Num ensaio de recetor, o material a ensaiar tal como o membro de ligação específica, é apropriadamente marcado e depois certas colónias celulares de teste são inoculadas com uma quantidade de material marcado e não marcado após o que são conduzidos estudos de ligação para determinar a extensão a que o material marcado se liga aos recetores celulares. Deste modo, as diferenças na afinidade entre materiais pode ser avaliada.

Assim, uma quantidade purificada do membro de ligação específica pode ser radiomarcada e combinada, por exemplo, com anticorpos ou outros inibidores para estes, após o que seriam conduzidos estudos de ligação. Seriam então preparadas soluções que contivessem várias quantidades de membro de ligação específica não combinado marcado e não marcado e seriam então inoculadas amostras celulares e a partir daí incubadas. As monocamadas celulares resultantes são então lavadas, solubilizadas e depois contadas num contador gama durante um tempo suficiente para produzir um erro padrão <5%. Estes dados são então sujeitos a análise Scatchard após o que se podem fazer observações e tirar conclusões em relação à atividade do material. Ao mesmo tempo que o anterior é exemplar, também ilustra o modo em que um ensaio de recetor pode ser efetuado e utilizado, no caso em que a capacidade de ligação celular do material ensaiado possa servir como característica distintiva.

Um ensaio útil e contemplado de acordo com o presente invento é conhecido como ensaio "cis/trans". Resumidamente, este ensaio emprega duas construções genéticas, uma das quais é tipicamente um plasmídeo que expressa continuamente um determinado recetor de interesse quando transfetado para uma linha celular apropriada e o segundo dos quais é um plasmídeo que expressa um repórter tal como luciferase, sob o controlo de um complexo recetor/ligando. Assim, por exemplo, se for desejado avaliar um composto como ligando para um determinado recetor, um dos plasmídeos seria uma construção que resulte em expressão do recetor na linha celular escolhida, ao mesmo tempo que o segundo plasmídeo possuiria um promotor ligado ao gene da luciferase em que o elemento de resposta ao recetor

particular é inserido. Se o composto em teste for um agonista para o recetor, o ligando complexar-se-á com o recetor e o complexo resultante ligar-se-á ao elemento de resposta e iniciará a transcrição do gene da luciferase. A quimioluminescência resultante é então medida fotometricamente e obtêm-se curvas de resposta à dose e comparam-se com as dos ligandos conhecidos. O protocolo anterior é descrito em detalhe na Patente U.S. N.º 4981784 e Publicação Internacional PCT N.º WO 88/03168, para cujo objetivo se refere o perito.

Noutra concretização deste invento, estojos de teste comerciais adequados para utilização por um médico especialista podem ser preparados para determinar a presença ou ausência de expressão aberrante de EGFR, incluindo mas não se limitando a EGFR amplificado e/ou uma mutação de EGFR, em células alvo suspeitas. De acordo com as técnicas de teste discutidas acima, uma classe de tais estojos conterá pelo menos o EGFR marcado ou o seu parceiro de ligação, por exemplo, um anticorpo específico para este, e orientações, claro, dependendo do método selecionado, p.ex., "competitivo", "em sanduíche", "DASP" e semelhante. Os estojos podem também conter reagentes periféricos tais como tampões, estabilizantes, etc.

Assim, um estojo de teste pode ser preparado para a demonstração da presença ou da capacidade de células para expressão aberrante ou modificação pós-tradução de EGFR, compreendendo:

- (a) uma quantidade predeterminada de pelo menos um componente imunoquimicamente reativo marcado obtido através da união direta ou indireta do presente membro de ligação específica ou de um parceiro de ligação específica a este, a um marcador detetável;
- (b) outros reagentes; e
- (c) orientações para utilização do referido estojo.

Mais especificamente, o estojo de teste de diagnóstico pode compreender:

- (a) uma quantidade conhecida do membro de ligação específica tal como descrito acima (ou um parceiro de ligação) geralmente ligado a uma fase sólida para formar um imunossorvente ou em

alternativa, ligado a uma etiqueta adequada ou mais desses produtos finais, etc. (ou seus parceiros de ligação) um de cada;

- (b) se necessário, outros reagentes; e
- (c) orientações para utilização do referido estojo de teste.

Noutra variação, o estojo de teste pode ser preparado e utilizado para os fins afirmados acima, o qual opera de acordo com um protocolo predeterminado (p.ex., "competitivo", "em sanduíche", "duplo anticorpo", etc.) e compreende:

- (a) um componente marcado que foi obtido através de conjugação do membro de ligação específica com um marcador detetável;
- (b) um ou mais reagentes imunoquímicos adicionais dos quais pelo menos um reagente é um ligando ou um ligando imobilizado, cujo ligando é selecionado de entre o grupo que consiste em:
 - (i) um ligando capaz de se ligar ao componente marcado (a);
 - (ii) um ligando capaz de se ligar a um parceiro de ligação do componente marcado (a);
 - (iii) um ligando capaz de se ligar a pelo menos um dos componentes a determinar; e
 - (iv) um ligando capaz de se ligar a pelo menos um dos parceiros de ligação de pelo menos um dos componentes a determinar; e
- (c) orientações para o desempenho de um protocolo para a deteção e/ou determinação de um ou mais componentes de uma reação imunoquímica entre o EGFR, o membro de ligação específica e um parceiro de ligação específica a este.

De acordo com o anterior, pode ser preparado um sistema de ensaio para pesquisa de potenciais fármacos eficazes para modular a atividade do EGFR, a expressão aberrante ou a modificação pós-tradução do EGFR, e/ou a atividade ou ligação do membro de ligação específica. O recetor ou o membro de ligação pode ser introduzido num sistema de teste e o fármaco prospectivo pode também ser introduzido na cultura celular resultante e a cultura examinada a partir daí para se observar quaisquer alterações na atividade em fase S das células, devido à adição do fármaco prospectivo sozinho ou devido ao

efeito de quantidades adicionadas do agente ou agentes conhecidos.

Ácidos Nucleicos

O presente invento proporciona ainda um ácido nucleico isolado codificando um membro de ligação específica do presente invento. Ácido nucleico inclui ADN e ARN. Num aspeto preferido, o presente invento proporciona um ácido nucleico que codifica para um polipéptido do presente invento tal como definido acima, incluindo um polipéptido tal como exposto como resíduos 115-123 de SEQ ID NO:2 ou 44-54, 68-83 e 115-123 de SEQ ID NO:2, um polipéptido tal como exposto nos resíduos 44-54, 70-76 e 109-117 de SEQ ID NO:4 e os polipéptidos inteiros de SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4.

O presente invento proporciona também construções na forma de plasmídeos, vetores, cassetes de transcrição ou expressão que compreendem pelo menos um polinucleótido tal como acima.

O presente invento proporciona também uma célula hospedeira recombinante que compreende uma ou mais construções tal como acima. Um ácido nucleico codificando qualquer membro de ligação específica tal como proporcionado forma em si mesmo um aspetto do presente invento, tal como o faz um método de produção do membro de ligação específica cujo método compreende a expressão do ácido nucleico codificando para este. A expressão pode ser convenientemente alcançada através de cultura sob condições apropriadas de células hospedeiras recombinantes contendo o ácido nucleico. Após produção através de expressão um membro de ligação específica pode ser isolado e/ou purificado utilizando qualquer técnica adequada, depois utilizado conforme apropriado.

Os membros de ligação específica e moléculas de ácido nucleico de codificação e vetores de acordo com o presente invento podem ser proporcionados isolados e/ou purificados, p.ex. a partir do seu ambiente natural, numa forma substancialmente pura ou homogénea, ou, no caso de um ácido nucleico, livre ou substancialmente livre de ácidos nucleicos ou genes de origem diferente daquela da sequência codificando

um polipéptido com a função requerida. O ácido nucleico de acordo com o presente invento pode compreender ADN ou ARN e pode ser totalmente ou parcialmente sintético.

Os sistemas para clonagem e expressão de um polipéptido numa variedade de diferentes células hospedeiras são bem conhecidos. Células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células de mamífero, levedura e sistemas de baculovírus. Linhas celulares de mamífero disponíveis na arte para expressão de um polipéptido heterólogo incluem células de ovário de hamster chinês, células HeLa, células de rim de hamster bebé, células de melanoma de ratinho NSO e muitas outras. Um hospedeiro bacteriano preferido comum é *E. coli*.

A expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpo em células procarióticas tais como *E. coli* está bem estabelecida na arte. Para uma revisão, ver por exemplo, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551, 1991. A expressão em células eucarióticas em cultura está também disponível aos peritos na especialidade como uma opção para produção de um membro de ligação específica, para revisões recentes ver, por exemplo, Raff, M.E., *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576, 1993; Trill, J.J. et al., *Curr. Opinion Biotech.* 6: 553-560, 1995.

Vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências promotoras, sequências terminadoras, sequências de poliadenilação, sequências estimuladoras, genes marcadores e outras sequências conforme apropriado. Os vetores podem ser plasmídeos, virais, p.ex. fagos ou fagomídeos, conforme apropriado. Para mais detalhes ver, por exemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2^ª edição, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muitas técnicas e protocolos conhecidos para manipulação de ácido nucleico, por exemplo na preparação de construções de ácido nucleico, mutagénese, sequenciação, introdução de ADN em células e expressão de genes, e análise de proteínas, estão descritos em detalhe em "Short Protocols in Molecular Biology", Segunda Edição, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Assim, outro aspeto do presente invento proporciona uma célula hospedeira contendo um ácido nucleico tal como aqui

divulgado. É aqui também divulgado um método compreendendo a introdução de um tal ácido nucleico numa célula hospedeira. A introdução pode empregar qualquer técnica disponível. Para células eucarióticas, as técnicas adequadas pode incluir transfecção com fosfato de cálcio, DEAE-Dextrano, electroporação, transfecção mediada por lipossomas e transdução utilizando retrovírus ou outros vírus, p.ex., vacinia ou, para células de inseto, baculovírus. Para células bacterianas, técnicas adequadas podem incluir transformação com cloreto de cálcio, electroporação e transfecção utilizando bacteriófagos.

A introdução pode ser seguida por causar ou permitir a expressão do ácido nucleico, p.ex., através de cultura das células hospedeiras sob condições para expressão do gene.

Numa concretização, o ácido nucleico do presente invento é integrado no genoma (p.ex., cromossoma) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida através da inclusão de sequências que promovam a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas padrão.

O presente invento proporciona também um método que compreende a utilização de uma construção tal como afirmado acima num sistema de expressão para expressar um membro de ligação específica ou polipéptido tal como acima.

Tal como afirmado acima, o presente invento também se refere a uma molécula de ADN recombinante ou gene clonado ou uma sua variante degenerada, que codifique um membro de ligação específica, particularmente anticorpo ou um seu fragmento, que possua uma sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID NO:2 e/ou SEQ ID NO:4; de preferência uma molécula de ácido nucleico, em particular uma molécula de ADN recombinante ou gene clonado, codificando o membro de ligação ou anticorpo como sequência nucleotídica ou seja complementar a uma sequência de ADN proporcionada em SEQ ID NO:1 e/ou SEQ ID NO:3.

Outra característica deste invento é a expressão das sequências de ADN tal como aqui divulgada. Tal como é bem conhecido na arte, as sequências de ADN podem ser expressas

ligando-as operativamente a uma sequência de controlo da expressão num vetor de expressão apropriado e empregando esse vetor de expressão para transformar um hospedeiro unicelular apropriado.

Tal ligação operativa de uma sequência de ADN deste invento a uma sequência de controlo da expressão, inclui, claro, se não fizer já parte da sequência de ADN, a condição de um codão de iniciação, ATG, no enquadramento de leitura correcto a montante da sequência de ADN.

Pode ser empregue uma ampla variedade de combinações hospedeiro/vetor de expressão na expressão das sequências de ADN deste invento. Vetores de expressão úteis podem, por exemplo, consistir em segmentos de sequências de ADN cromossómicas, não cromossómicas e sintéticas. Vetores adequados incluem derivados de SV40 e plasmídeos bacterianos conhecidos, p.ex., plasmídeos de *E. coli* col El, pCR1, pBR322, pMB9 e seus derivados, plasmídeos tais como RP4; ADN fágicos, p.ex., os numerosos derivados do fago , p.ex., NM989 e outro ADN fágico, p.ex., M13 e ADN fágico filamentoso de cadeia simples; plasmídeos de levedura tais como o plasmídeo 2 μ ou seus derivados; vetores úteis em células eucarióticas, tais como vetores úteis em células de inseto ou de mamífero; vetores derivados de combinações de plasmídeos e ADN fágicos, tais como plasmídeos que foram modificados para empregar ADN fágico ou outras sequências de controlo da expressão; e semelhantes.

Qualquer um de uma ampla variedade de sequências de controlo da expressão - sequências que controlam a expressão de uma sequência de ADN operativamente ligada a ela - pode ser utilizada nestes vetores para expressar as sequências de ADN deste invento. Tais sequências de controlo da expressão úteis incluem, por exemplo, os promotores inicial ou tardio de SV40, CMV, vacínia, polioma ou adenovírus, o sistema *lac*, o sistema *trp*, o sistema *TAC*, o sistema *TRC*, o sistema *LTR*, o operador principal e as regiões promotoras do fago , as regiões de controlo da proteína de revestimento fd, o promotor para a 3-fosfoglicerato-quinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores da fosfatase ácida (p.ex., Pho5), os promotores dos fatores de conjugação de levedura e outras sequências que se

saiba controlarem a expressão dos genes de células procarióticas ou eucarióticas ou dos seus vírus e suas combinações.

Uma ampla variedade de células hospedeiras unicelulares é também útil na expressão das sequências de ADN deste invento. Estes hospedeiros podem incluir hospedeiros eucarióticos e procarióticos bem conhecidos, tais como estirpes de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungos tais como leveduras, e células animais, tais como células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W e L-M, células do rim de Macaco Verde Africano (p.ex., COS1, COS7, BSC1, BSC40 e BMT10), células de inseto (p.ex., Sf9) e células humanas e células vegetais em cultura de tecidos.

Entender-se-á que nem todos os vetores, sequências de controlo da expressão e hospedeiros funcionarão igualmente para expressar as sequências de ADN deste invento. Nem todos os hospedeiros funcionarão igualmente bem com o mesmo sistema de expressão. No entanto, um perito na especialidade será capaz de selecionar os vetores apropriados, as sequências de controlo da expressão e os hospedeiros sem demasiada experimentação para alcançar a expressão desejada sem sair do âmbito deste invento. Por exemplo, ao selecionar um vetor, o hospedeiro tem de ser considerado porque o vetor tem de funcionar nele. O número de cópias do vetor, a capacidade para controlar esse número de cópias e a expressão de quaisquer outras proteínas codificadas pelo vetor, tais como marcadores antibióticos, serão também considerados.

Ao selecionar uma sequência de controlo da expressão, será normalmente considerada uma variedade de fatores. Estes incluem, por exemplo, a força relativa do sistema, a sua possibilidade de controlo e a sua compatibilidade com a sequência de ADN ou gene particular a expressar, particularmente em relação a potenciais estruturas secundárias. Os hospedeiros unicelulares adequados serão selecionados através de consideração, p.ex., da sua compatibilidade com o vetor escolhido, das suas características de secreção, da sua capacidade para dobrar proteínas corretamente e dos seus requisitos de fermentação, bem como a toxicidade para o hospedeiro do produto codificado

pelas sequências de ADN a expressar e a facilidade de purificação dos produtos de expressão.

Considerando estes e outros fatores um perito na especialidade será capaz de construir uma variedade de combinações vetor/sequência de controlo da expressão/hospedeiro que expressarão as sequências de ADN deste invento em fermentação ou em cultura de tecidos de larga escala.

Pretende-se ainda que análogos dos membros de ligação específica possam ser preparados a partir de sequências nucleotídicas do complexo/subunidade proteico derivado dentro do âmbito do presente invento. Análogos, tais como fragmentos, podem ser produzidos, por exemplo, através de digestão com pepsina do material do membro de ligação específica. Outros análogos, tais como muteínas, podem ser produzidos através de mutagénese dirigida ao local das sequências de codificação dos membros de ligação específica. Os análogos exibindo "atividade de membro de ligação específica" tais como pequenas moléculas, funcionando como promotores ou inibidores, podem ser identificados através de ensaios *in vivo* e/ou *in vitro* conhecidos.

Tal como mencionado acima, uma sequência de ADN codificando um membro de ligação específica pode ser preparada sinteticamente em vez de clonada. A sequência de ADN pode ser desenhada com os codões apropriados para a sequência de aminoácidos do membro de ligação específica. Em geral, selecionar-se-ão codões preferidos para o hospedeiro pretendido se a sequência for utilizada para expressão. A sequência completa é montada a partir de oligonucleótidos sobreponíveis preparados através de métodos padrão e montada numa sequência de codificação completa. Ver, p.ex., Edge, *Nature* 292: 756, 1981; Nambair *et al.*, *Science* 223: 1299, 1984; Jay *et al.*, *J. Biol. Chem.* 259: 6311, 1984.

As sequências de ADN sintéticas permitem uma construção conveniente de genes que expressarão análogos ou "muteínas" dos membros de ligação específica. Alternativamente, o ADN codificando muteínas pode ser feito através de mutagénese dirigida ao local de genes nativos dos membros de ligação

específica ou de ADNc e as mutações podem ser feitas diretamente utilizando síntese convencional de polipeptídos.

Um método geral para incorporação específica do local de aminoácidos não naturais em proteínas é descrito em Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science* 244: 182-188, Abril de 1989. Este método pode ser utilizado para criar análogos com aminoácidos não naturais.

A presente divulgação estende-se à preparação de oligonucleótidos anti-sentido e ribozimas que podem ser utilizados para interferir na expressão do EGFR ao nível da tradução. Esta abordagem utiliza ácido nucleico anti-sentido e ribozimas para bloquear a tradução de um ARNm específico, mascarando esse ARNm com um ácido nucleico anti-sentido ou clivando-o com uma ribozima.

Ácidos nucleicos anti-sentido são moléculas de ADN ou ARN que são complementares a pelo menos uma porção de uma molécula de ARNm específica (ver Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988). Na célula, hibridam com esse ARNm, formando uma molécula de cadeia dupla. A célula não traduz um ARNm nesta forma de cadeia dupla. Por essa razão, os ácidos nucleicos anti-sentido interferem com a expressão do ARNm em proteína. Oligómeros de cerca de quinze nucleótidos e moléculas que hibridam com o codão de iniciação AUG serão particularmente eficientes, uma vez que são fáceis de sintetizar e é provável que coloquem menos problemas que moléculas maiores quando são introduzidas nas células produtoras. Métodos anti-sentido foram utilizados para inibir a expressão de muitos genes *in vitro* (Marcus-Sekura, 1988; Hambor *et al.*, 1988).

As ribozimas são moléculas de ARN possuindo a capacidade para clivar especificamente outras moléculas de ARN de cadeia simples de uma maneira de algum modo análoga às endonucleases de restrição de ADN. As ribozimas foram descobertas a partir da observação de que certos ARNm têm a capacidade para excisar os seus próprios intrôns. Ao modificar a sequência nucleotídica destes ARN, os investigadores foram capazes de conceber moléculas que reconhecem sequências nucleotídicas específicas numa molécula de ARN e a clivam (Cech, 1988).

Porque são específicos da sequência, apenas os ARNm com determinadas sequências são inactivados.

Os investigadores identificaram dois tipos de ribozimas, o tipo *Tetrahymena* e o tipo "cabeça-de-martelo" (Hasselhoff e Gerlach, 1988). As ribozimas do tipo *Tetrahymena* reconhecem sequências de quatro bases, enquanto as do tipo "cabeça-de-martelo" reconhecem sequências de onze a dezoito bases. Quanto maior a sequência de reconhecimento, mais provável é que ocorra exclusivamente na espécie de ARNm alvo. Por essa razão, as ribozimas do tipo cabeça-de-martelo são preferíveis às ribozimas do tipo *Tetrahymena* para inactivação de uma espécie de ARNm específica e sequências de reconhecimento de dezoito bases são preferíveis a sequências de reconhecimento mais curtas.

As sequências de ADN tal como aqui descritas podem assim ser utilizadas para preparar moléculas anti-sentido contra, e ribozimas que clivam, ARNm para EGFR e seus ligandos.

O presente invento pode ser melhor compreendido através de referência aos seguintes Exemplos não limitantes, que são proporcionados como exemplares do presente invento.

EXEMPLO 1

ISOLAMENTO DE ANTICORPOS

MATERIAIS

Linhos celulares

Para imunização e análises de especificidade, foram utilizadas várias linhas celulares, nativas ou transfectadas com o gene normal, de tipo selvagem ou "wtEGFR" ou o gene EGFR possuindo a mutação de deleção -2: linha celular de fibroblastos de murídeo NR6, NR6_{EGFR} (transfetada com EGFR) e NR6_{wtEGFR} (transfetada com wtEGFR), linha celular de glioblastoma humano U87MG (expressando níveis baixos de wtEGFR endógeno), U87MG_{wtEGFR} (transfetada com wtEGFR), U87MG_{EGFR} (transfetada com EGFR) e linha celular de carcinoma de células escamosas humano A431 (expressando níveis elevados de wtEGFR) [38]. As linhas celulares e transfeções foram

descritas anteriormente (Nishikawa R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(16): 7727-7731, 1994).

A linha celular de astrocitoma U87MG (20), que expressa endogenamente níveis baixos de EGFR wt, foi infetada com um retrovírus contendo o EGFR de2-7 para produzir a linha celular U87MG. 2-7 (10). A linha celular transfectada U87MG.wtEGFR foi produzida tal como descrito em Nagane et al., 1996 (*Cancer Res.* 56: 5079-5086). Enquanto as células U87MG expressam aproximadamente 1×10^5 EGFR, as células U87MG.wtEGFR expressam aproximadamente 1×10^6 EGFR e assim imitam a situação observada com a amplificação do gene.

As células A431 de carcinoma escamoso humano foram obtidas em ATCC (Rockville, MD). Todas as linhas celulares foram cultivadas em DMEM/F-12 com GlutaMAX™ (Life Technologies, Melbourne, Austrália) suplementado com FCS a 10% (CSL, Melbourne, Austrália).

Reagentes

Os péptidos de junção únicos biotinilados (Biotina-LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO:5) e LEEKKGNYVVTDH-Biotina (SEQ ID NO:6)) de EGFR de2-7 foram sintetizados através de química Fmoc padrão e a pureza (>96%) foi determinada através de HPLC de fase inversa e análise espectral de massa (Auspep, Melbourne, Austrália).

Anticorpos utilizados nos estudos

Para comparar as nossas descobertas com outros reagentes, foram incluídos mAb adicionais nos nossos estudos. Estes reagentes foram mAb 528 para o wtEGFR (Sato, J.D. et al., *Mol. Biol. Med.* 1(5): 511-529, 1983) e DH8.3, que foi gerado contra um péptido sintético abrangendo a sequência de junção da mutação de deleção 2-7 de EGFR. O anticorpo DH8.3 (IgG1) foi descrito anteriormente (Hills et al., *Int. J. Cancer* 63(4): 537-543, 1995) e foi obtido após imunização de ratinhos com o péptido de junção único encontrado em EGFR de2-7 (16). O anticorpo 528, que reconhece tanto de2-7 como o EGFR de tipo selvagem, foi descrito anteriormente (21) e foi produzido na *Biological Production Facility* (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) utilizando um hibridoma obtido em ATCC HB-8509. SC-03 é um anticorpo policlonal de coelho purificado

por afinidade criado contra um péptido carboxi-terminal do EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIOS

A linha de fibroblastos de murídeo NR6 EGFR foi utilizada como imunogénio. Foram gerados hibridomas de ratinho através de imunização de ratinhos Balb/c cinco vezes subcutaneamente em intervalos de 2 a 3 semanas, com 5×10^5 - 2×10^6 células em adjuvante. O adjuvante completo de Freund foi utilizado para a primeira injeção. A partir daí, foi utilizado adjuvante incompleto de Freund (Difco). Células de baço de ratinhos imunizados foram fundidas com a linha celular de mieloma de ratinho SP2/0. Os sobrenadantes dos clones recentemente gerados foram pesquisados em ensaios de hemoadsorção quanto à reatividade com a linha celular NR6, NR6_{WT}EGFR e NR6 EGFR e depois analisados através de ensaios de hemoadsorção com as linhas celulares de glioblastoma humano U87MG, U87MG_{WT}EGFR e U87MG EGFR. Os sobrenadantes dos hibridomas selecionados foram subsequentemente testados através de *Western blotting* e melhor analisados através imuno-histoquímica. Os mAb recentemente gerados mostrando o padrão de reatividade esperado foram purificados.

Cinco hibridomas foram estabelecidos e três, clones 124 (IgG2a), 806 (IgG2b) e 1133 (IgG2a), foram selecionados para melhor caracterização com base no elevado título com NR6 EGFR e baixo fundo em células NR6 e NR6_{WT}EGFR no ensaio de hemaglutinação. Numa análise de hemaglutinação subsequente, estes anticorpos não mostraram reatividade (sobrenadante não diluído $\leq 10\%$) com a linha celular de glioblastoma humano nativa U87MG e U87MG_{WT}EGFR, mas foram fortemente reativos com U87MG EGFR menor reatividade foi observada com A431. Em contraste, em análise FACS, 806 não foi reativo com U87MG nativa e corou intensamente U87MG EGFR e num menor grau U87MG_{WT}EGFR indicando ligação de 806 a ambos EGFR e wtEGFR (ver abaixo).

Em ensaios *Western blot*, os mAb 124, 806 e 1133 foram então analisados quanto à reatividade com wtEGFR e EGFR. Lisados de detergente foram extraídos de NR6 EGFR U87MG EGFR bem como de A431. Todos os três mAb mostraram um padrão de reatividade semelhante com lisados celulares corando tanto a

proteína wtEGFR (170 kDa) como EGFR (140 kDa). Como reagente de referência, o mAb R.I que se sabe ser reativo com o wtEGFR (Waterfield M.D. et al., *J. Cell Biochem.* 20(2): 149-161, 1982) foi utilizado em vez do mAb 528, que se sabe ser não reativo em análise *Western blot*. O mAb R.I mostrou reatividade com wtEGFR e EGFR. Todos os três clones recentemente gerados mostraram reatividade com EGFR e menos intensa com wtEGFR. DH8.3 foi positivo apenas no lisado de U87MG EGFR e NR6 EGFR.

A análise imuno-histoquímica dos clones 124, 806 e 1133 bem como do mAb 528 e do mAb DH8.3 nos tumores de xenoenxerto U87MG, U87MG EGFR e A431 é mostrada na **Tabela 1**. Todos os mAb mostraram forte coloração do xenoenxerto U87MG EGFR. Apenas o mAb 528 mostrou uma fraca reatividade no xenoenxerto U87MG nativo. Em xenoenxertos A431, o mAb 528 mostrou forte reatividade homogénea. Os mAb 124, 806 e 1133 revelaram reatividade principalmente com as células localizadas basalmente do carcinoma de células escamosas de A431 e não reagiram com as camadas celulares superiores ou a componente queratinizante. DH8.3 foi negativo em xenoenxertos A431.

TABELA 1

Análise Imuno-histoquímica dos Anticorpos 528, DH8.3 e 124, 806 e 1133

mAb	xenoenxerto AU87MG EGFR	xenoenxerto A431	xenoenxerto U87MG (nativo)
528	pos.	pos.	pos. (coloração focal)
mAb-124	pos.	pos. (predominantemente células basais)	-
mAb-806	pos.	pos. (predominantemente células basais)	-
mAb-1133	pos.	pos. predominantemente (células basais)	-
DH8.3	pos.	-	-

Coloração mínima do estroma devido a deteção de anticorpos endógenos de ratinho

EXEMPLO 2

LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS A LINHAS CELULARES POR FACS

Para determinar a especificidades do mAb 806, a sua ligação às células U87MG, U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR foi

analizada através de separação de células ativada por fluxo (FACS). Resumidamente, as células foram marcadas com o anticorpo relevante (10 µg/ml) seguido de IgG de cabra anti-ratinho conjugado com fluoresceína (diluição 1:100; Calbiochem San Diego, USA). Os dados de FACS foram obtidos num Coulter Epics Elite ESP através da observação de um mínimo de 5000 eventos e analisados utilizando EXPO (versão 2) para Windows. Foi incluído um IgG2b irrelevante como controlo do isotipo para mAb 806 e o anticorpo 528 foi incluído uma vez que reconhece tanto o EGFR de2-7 como wt.

Apenas o anticorpo 528 foi capaz de corar a linha celular parental U87MG (**Figura 1**) consistente com relatórios anteriores demonstrando que estas células expressam o EGFR wt (Nishikawa *et al.* 1994). O mAb 806 e DH8.3 tiveram níveis de ligação semelhantes aos do anticorpo de controlo, demonstrando claramente que eram incapazes de se ligar ao recetor wt (**Figura 1**). A ligação do anticorpo de controlo do isotipo a células U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR foi semelhante à observada para as células U87MG.

O mAb 806 corou as células U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR, indicando que o mAb 806 reconhece especificamente o EGFR de2-7 e o EGFR amplificado (**Figura 1**). O anticorpo DH8.3 corou células U87MG. 2-7, confirmando que o anticorpo DH8.3 reconhece especificamente o EGFR de2-7 (**Figura 1**). Tal como esperado, o anticorpo 528 corou tanto a linha celular U87MG. 2-7 como U87MG.wtEGFR (**Figura 1**). Tal como esperado, o anticorpo 528 corou U87MG. 2-7 com uma intensidade maior que a célula parental uma vez que se liga tanto aos recetores de2-7 como aos de tipo selvagem que são co-expressos nestas células (**Figura 1**). Foram obtidos resultados semelhantes utilizando uma hemoadsorção mista de proteína A que deteta IgG ligada à superfície através do aparecimento de proteína A revestida com glóbulos vermelhos humanos (grupo 0) a células alvo. O anticorpo monoclonal 806 foi reativo com células U87MG. -2 mas não mostrou reatividade significativa (sobrenadante não diluído inferior a 10%) com U87MG que expressa EGFR de tipo selvagem.

EXEMPLO 3**LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS EM ENSAIOS**

Para melhor caracterizar a especificidade do mAb 806 e do anticorpo DH8.3, a sua ligação foi examinada através de ELISA. Foram utilizados dois tipos de ELISA para determinar a especificidade dos anticorpos. No primeiro ensaio, as placas foram revestidas com sEGFR (10 µg/ml em tampão carbonato 0,1 M, pH 9,2) durante 2 h e depois bloqueadas com albumina de soro humano (HSA) a 2% em PBS. sEGFR é o domínio extracelular recombinante (aminoácidos 1-621) do EGFR de tipo selvagem) e foi produzido tal como anteriormente descrito (22). Os anticorpos foram adicionados a poços em triplicado a concentração crescente em HSA a 2% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O anticorpo ligado foi detetado através de anti-IgG de ratinho de ovelha conjugado com peroxidase de rábano (Silenus, Melbourne, Austrália) utilizando ABTS (Sigma, Sydney, Austrália) como substrato e a absorbância foi medida a 405 nm.

Tanto o mAb 806 como o anticorpo 528 apresentaram curvas de dependência da dose e de saturação da ligação para o sEGFR de tipo selvagem imobilizado (**Figura 2A**). Uma vez que o péptido de junção único encontrado no EGFR de2-7 não está contido dentro do sEGFR, o mAb 806 tem que se estar a ligar a um epítopo situado dentro da sequência do EGFR de tipo selvagem. A ligação do anticorpo 528 foi inferior à observada para o mAb 806. Tal como esperado o anticorpo DH8.3 não se ligou ao sEGFR de tipo selvagem mesmo a concentrações até 10 µg/ml (**Figura 2A**). Embora o sEGFR em solução inibisse a ligação do anticorpo 528 ao sEGFR imobilizado de um modo dependente da dose, foi incapaz de inibir a ligação de mAb 806 (**Figura 2B**). Isto sugere que o mAb 806 se pode ligar apenas ao EGFR de tipo selvagem uma vez imobilizado em placas de ELISA, um processo que pode induzir alterações conformacionais. Foram observados resultados semelhantes utilizando um BIAcore no qual o mAb 806 se ligou a sEGFR imobilizado mas o mAb 806 imobilizado não foi capaz de se ligar a sEGFR em solução (dados não mostrados). O anticorpo DH8.3 exibiu dependência da dose e ligação saturável ao péptido único de EGFR de2-7 (**Figura 2C**).

Num segundo ensaio, o péptido de2-7 biotinilado específico (Biotina-LEEKKGNVVTDH (SEQ ID NO:5)) ligou-se a placas de ELISA pré-revestidas com estreptavidina (Pierce, Rockford, Illinois). Os anticorpos foram ligados e detetados tal como no primeiro ensaio. Nem o mAb 806 nem o anticorpo 528 se ligaram ao péptido, mesmo a concentrações mais elevadas que as utilizadas para obter saturação da ligação de DH8.3, indicando também que o mAb 806 não reconhece um determinante de epítopo dentro deste péptido.

Para mais bem demonstrar que o mAb 806 reconhece um epítopo distinto do péptido de junção, foram efetuadas experiências adicionais. O péptido de2-7 C-terminal biotinilado (LEEKKGNVVTDH-Biotina (SEQ ID NO:6)) foi utilizado em estudos com mAb806 e mAb L8A4, gerados contra o péptido de2-7 (Reist, C.J. et al., *Cancer Res.* 55(19): 4375-4382, 1995; Foulon, C.F. et al., *Cancer Res.* 60(16): 4453-4460, 2000).

Reagentes utilizados em Estudos de Péptidos:

Péptido de junção: LEEKKGNVVTDH-OH (Biosource, Camarillo, CA);
Péptido C: LEEKKGNVVTDH(K-Biot)-OH (Biosource, Camarillo, CA);
SEGFR: domínio extracelular recombinante solúvel derivado de células CHO (aa 1-621) do EGFR de tipo selvagem (LICR Melbourne);
mAb 806: anticorpo monoclonal de ratinho, IgG_{2b} (LICR NYB);
mAb L8A4: anticorpo monoclonal de ratinho, IgG₁ (Duke University);
mAb de controlo do isotipo IgG₁;
mAb de controlo do isotipo IgG_{2b}.

O péptido C foi imobilizado num *chip* microssensor de Estreptavidina a uma densidade superficial de 350 RU (\pm 30 RU). Foram testadas diluições em série dos mAb quanto à reatividade com o péptido. Foram efetuadas experiências de bloqueio utilizando péptido não biotinilado para avaliar a especificidade.

O mAb L8A4 mostrou forte reatividade com o Péptido C mesmo a baixas concentrações de anticorpo (6,25 nM) (**Figura 2D**). O mAb 806 não mostrou reatividade específica

detetável com o péptido C até às concentrações de anticorpo de 100 nM (maior concentração testada) (**Figuras 2D e 2E**). Esperava-se que o mAb L8A4 reagisse com o Péptido C porque o péptido foi utilizado como imunogénio na geração do mAb L8A4. A adição do Péptido de Junção (não biotinilado, 50 µg/ml) bloqueia completamente a reatividade do mAb L8A4 com o Péptido C, confirmando a especificidade do anticorpo para o epítopo do péptido de junção.

Num segundo conjunto de experiências BIAcore, sEGFR foi imobilizado num *chip* microssensor CM a uma densidade superficial de ~4000 RU. As diluições em série dos mAb foram testadas quanto à reatividade com sEGFR.

O mAb 806 foi fortemente reativo com sEGFR desnaturado ao mesmo tempo que o mAb L8A4 não reagiu com sEGFR desnaturado. A reatividade do mAb 806 com o sEGFR desnaturado diminui com concentrações decrescentes do anticorpo. Esperava-se que o mAb L8A4 não reagisse com sEGFR porque o mAb L8A4 foi gerado utilizando o péptido de junção como imunogénio e sEGFR não contém o péptido de junção.

Foram também efetuadas experiências de coloração imunitária *dot blot*. Diluições em série do péptido foram aplicadas a 0,5 µl sobre membranas de PVDF ou nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com BSA a 2% em PBS e depois sondadas com os anticorpos 806, L8A4, DH8.3 e de controlo. Os anticorpos L8A4 e DH8.3 ligaram-se ao péptido nas membranas (dados não mostrados). O Mab806 não se ligou ao péptido nas concentrações em que o L8A4 mostrou claramente ligação (dados não mostrados). Os anticorpos de controlo foram também negativos quanto à ligação ao péptido.

O mAb 806 ligou-se a wtEGFR em lisados celulares após imunomarcação (resultados não mostrados). Isto é diferente dos resultados obtidos com anticorpo DH8.3, que reagiu com EGFR de2-7 mas não com wtEGFR. Assim, o mAb 806 pode reconhecer o wtEGFR após desnaturação mas não quando o receptor está no seu estado natural à superfície celular.

EXEMPLO 4**ANÁLISE SCATCHARD**

Foi efetuada uma análise Scatchard utilizando células U87MG. 2-7 após correção para a imunorreatividade para determinar a afinidade relativa de cada anticorpo. Os anticorpos foram marcados com ^{125}I (Amrad, Melbourne, Austrália) através do método da clorammina T e a imunorreatividade foi determinada através de ensaio de Lindmo (23). Todos os ensaios de ligação foram efetuados em HSA a 1%/PBS em $1-2 \times 10^6$ células U87MG. 2-7 ou A431 vivas durante 90 min a 4°C com rotação suave. Foi utilizada uma concentração estabelecida de 10 ng/ml de anticorpo marcado com ^{125}I na presença de concentrações crescentes do anticorpo não marcado apropriado. A ligação não específica foi determinada na presença de um excesso de 10000 vezes de anticorpo não marcado. Após a incubação estar completa, as células foram lavadas e contadas quanto a anticorpo marcado com ^{125}I ligado utilizando um contador gama COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, USA).

Tanto o anticorpo mAb 806 como DH8.3 mantiveram uma elevada imunorreatividade quando iodados que foi tipicamente superior a 90% para o mAb 806 e 45-50% para o anticorpo DH8.3. O mAb 806 teve uma afinidade para o recetor EGFR de 2-7 de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ enquanto a afinidade do DH8.3 foi umas 10 vezes inferior a $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Nem o mAb 806 radiomarcado com ^{125}I nem o anticorpo DH8.3 radiomarcado com ^{125}I se ligaram às células U87MG parentais. O mAb 806 reconheceu uma média de $2,4 \times 10^5$ locais de ligação por célula com o anticorpo DH8.3 a ligar-se a uma média de $5,2 \times 10^5$ locais. Assim, houve não só uma boa concordância no número de recetores entre os anticorpos como também com um relatório anterior mostrando $2,5 \times 10^5$ recetores de 2-7 por célula medidos através de um anticorpo específico de EGFR de 2-7 na mesma linha celular (25).

EXEMPLO 5**INTERNALIZAÇÃO DOS ANTICORPOS POR CÉLULAS U87MG. 2-7**

A taxa de internalização do anticorpo após ligação a uma célula alvo influencia tanto as suas propriedades de

direcionamento para o tumor como as opções terapêuticas. Consequentemente, os inventores examinaram através de FACS a internalização do mAb 806 e do anticorpo DH8.3 após ligação a células U87MG. As células U87MG foram incubadas com mAb 806 ou o anticorpo DH8.3 (10 µg/ml) durante 1 h em DMEM a 4°C. Após lavagem, as células foram transferidas para DMEM pré-aquecido a 37°C e foram tomadas alíquotas a vários momentos após incubação a 37°C. A internalização foi parada lavando imediatamente as alíquotas em tampão de lavagem gelado (HSA a 1%/PBS). Ao completar o tempo as células foram coradas através de FACS tal como descrito acima. A percentagem de internalização foi calculada através de comparação da coloração da superfície com anticorpo a vários momentos em relação ao momento zero utilizando a fórmula: percentagem de anticorpo internalizado = (fluorescência média no tempo x fluorescência de fundo)/(fluorescência média no tempo 0 - fluorescência de fundo)×100. Este método foi validado num ensaio utilizando um anticorpo iodado (mAb 806) para medir a internalização tal como anteriormente descrito (24). As diferenças na velocidade de internalização em diferentes momentos foram comparadas utilizando o teste t de Student.

Ambos os anticorpos mostraram uma internalização relativamente rápida atingindo níveis estáveis aos 10 min para o mAb 806 e aos 30 min para DH8.3 (**Figura 3**). A internalização de DH8.3 foi significativamente maior tanto em termos de velocidade (80,5% de DH8.3 internalizado aos 10 min em comparação com 36,8% para mAb 806, $p<0,01$) como de quantidade total internalizada aos 60 min (93,5% versus 30,4%, $p<0,001$). O mAb 806 mostrou níveis de internalização ligeiramente inferiores aos 30 e 60 min em comparação com os 20 min em todos os 4 ensaios efetuados (**Figura 3**). Estes resultado foi também confirmado utilizando um ensaio de internalização baseado em mAb 806 iodado.

EXEMPLO 6

ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÓNICA DA INTERNALIZAÇÃO DO ANTICORPO

Dada a diferença acima observada nas velocidades de internalização entre os anticorpos, foi efetuada uma análise

detalhada do tráfico intracelular do anticorpo utilizando microscopia eletrónica.

Células U87MG. -2 foram criadas em lâminas de câmaras revestidas com gelatina (Nunc, Naperville, IL) até 80% de confluência e depois lavadas com DMEM gelado. As células foram então incubadas com mAb 806 ou o anticorpo DH8.3 em DMEM durante 45 min a 4°C. Após lavagem, as células foram incubadas durante mais 30 min com anti-IgG de ratinho conjugado com ouro (partículas de 20 nm) (BBInternational, Cardiff, UK) a 4°C. Após outra lavagem, foi adicionado às células DMEM/FCS a 10% pré-aquecido, e foram incubadas a 37°C durante vários tempos de 1-60 min. A internalização do anticorpo foi parada através de meio gelado e as células fixadas com glutaraldeído a 2,5% em PBS/HSA a 0,1% e depois pós-fixadas em tetra-óxido de ósmio a 2,5%. Após desidratação através de uma série gradual de acetona, as amostras foram impregnadas em resina Epon/Araldite, cortadas como secções ultrafinas com um micrótomo Reichert Ultracut-S (Leica) e colhidas em redes de níquel. As secções foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo antes de serem observadas num microscópio eletrónico de transmissão Philips CM12 a 80 kV. A análise estatística dos grãos de ouro contidos dentro das depressões revestidas foi efetuada utilizando um teste de Qui quadrado.

Ao mesmo tempo que o anticorpo DH8.3 era internalizado predominantemente através das depressões revestidas, o mAb 806 parecia ser internalizado através de macropinocitose (**Figura 19**). De facto, uma análise detalhada de 32 depressões revestidas formadas em células incubadas com mAb 806 revelou que nenhuma delas continha anticorpo. Em contraste, cerca de 20% de todas as depressões revestidas de células incubadas com DH8.3 eram positivos para o anticorpo, com várias contendo múltiplos grãos de ouro. Uma análise estatística do número total de grãos de ouro contidos dentro das depressões revestidas verificou que a diferença era altamente significativa ($p<0,01$). Após 20-30 min ambos os anticorpos podiam ser observados em estruturas que morfologicamente se assemelham a lisossomas. A presença de restos celulares dentro destas estruturas foi também consistente com a sua natureza de lisossoma.

EXEMPLO 7**BIODISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPOS EM RATINHOS NUS POSSUINDO TUMORES**

A biodistribuição de mAb 806 e do anticorpo DH8.3 foi comparada em ratinhos nus contendo xenoenxertos U87MG num lado e xenoenxertos U87MG. 2-7 do outro. Foi escolhido um período de tempo relativamente curto para este estudo uma vez que um relatório anterior demonstrou que o anticorpo DH8.3 mostra níveis de pico de direcionamento para os tumores entre as 4-24 h (16).

Xenoenxertos tumorais foram estabelecidos em ratinhos nus Balb/c através de injeção s.c. de 3×10^6 células U87MG, U87MG. 2-7 ou A431. A expressão de EGFR de2-7 em xenoenxertos U87MG. 2-7 permaneceu estável ao longo do período de biodistribuição. Também, as células A431 mantiveram a sua reatividade com mAb 806 quando criadas como xenoenxertos tumorais tal como determinado através de imuno-histoquímica (dados não mostrados). As células U87MG ou A431 foram injetadas num lado 7-10 dias antes das células U87MG. -2 serem injetadas no outro lado devido à velocidade de crescimento mais rápida observada para o xenoenxertos que expressam EGFR de2-7. Os anticorpos foram radiomarcados e avaliados quanto à imunorreatividade tal como descrito acima e foram injetados em ratinhos através da via retro-orbital quando os tumores tinham 100-200 mg de peso. Cada ratinho recebeu dois anticorpos diferentes (2 μ g por anticorpo): 2 μ Ci de mAb 806 marcado com ^{125}I e 2 μCi de DH8.3 ou 528 marcados com ^{131}I . A menos que indicado, foram sacrificados grupos de 5 ratinhos a vários momentos pós-injeção e o sangue obtido através de punção cardíaca. Os tumores, fígado, baço, rins e pulmões foram obtidos através de dissecção. Todos os tecidos foram pesados e ensaiados quanto à atividade de ^{125}I e ^{131}I utilizando uma Janela de contagem de dois canais. Os dados foram expressos para cada anticorpo como % ID/g de tumor determinados através de comparação com padrões de doses injetadas ou convertidos em razões de tumor para sangue/fígado (i.e. % ID/g de tumor dividida por % ID/g de sangue ou fígado). As diferenças entre grupos foram analisadas através do teste t de Student.

Em termos de % de ID/g de tumor, o mAb 806 alcançou o seu nível de pico em xenoenxertos U87MG. -2 de 18,6% m/g de tumor às 8 h (**Figura 4A**), consideravelmente mais elevado que qualquer outro tecido exceto sangue. Ao mesmo tempo DH8.3 também mostrou níveis de pico do tumor às 8 h, o nível foi estatisticamente ($p<0,001$) inferior 8,8% m/g de tumor em comparação com o mAb 806 (**Figura 4B**). Os níveis de ambos os anticorpos decaíram lentamente às 24 e 48 h. Nenhum dos anticorpos mostrou direcionamento específico para os xenoenxertos U87MG parentais (**Figura 4A,B**). Em relação às razões de tumor para sangue/fígado, o mAb 806 mostrou a razão mais elevada às 24 h tanto para o sangue (razão de 1,3) como para o fígado (razão de 6,1) (**Figura 5A,B**). O anticorpo DH8.3 teve a sua razão mais elevada no sangue às 8 h (razão de 0,38) e às 24 h no fígado (razão de 1,5) (**Figura 5 A,B**), as quais são ambas consideravelmente inferiores aos valores obtidos para mAb 806.

Tal como descrito acima, os níveis de mAb 806 no tumor tem um pico às 8 horas. Embora este pico seja relativamente precoce em comparação com muitos anticorpos de direcionamento para tumores, é completamente consistente com outros estudos utilizando anticorpos específicos para EGFR de2-7 que apresentam todos picos às 4-24 horas pós-injeção quando se utiliza uma dose semelhante de anticorpo (16, 25, 33). De facto, ao contrário dos relatórios anteriores, o ponto das 8 h foi incluído com base no pressuposto de que o direcionamento do anticorpo atingiria rapidamente um pico. A % ID/g de tumor observada com o mAb 806 foi semelhante à relatada para outros anticorpos específicos de EGFR de2-7 quando se utilizam técnicas de iodação padrão (16, 24, 32). A razão para o pico inicial é provavelmente de duas vezes. Primeiramente, os tumores expressando o EGFR de2-7, incluindo as células U87MG transfectadas, crescem extremamente rápido como xenoenxertos tumorais. Assim, mesmo durante o período de tempo relativamente curto utilizado nestes estudos de biodistribuição, o tamanho do tumor aumenta até tal extensão (5-10 vezes de aumento em massa durante 4 dias) que a % ID/g do tumor é reduzida em comparação com tumores de crescimento lento. Secundariamente, ao mesmo tempo a internalização do mAb 806 foi relativamente lenta em comparação com DH8.3 é ainda rápido em relação a muitos outros sistemas

anticorpo/antigénio tumorais. Os anticorpos internalizados sujeitam-se a proteólise rápida sendo os produtos de degradação excretados da célula (34). Este processo de internalização, degradação e excreção reduz a quantidade de anticorpo iodado retida dentro da célula. Consequentemente, os anticorpos que internalizam apresentam níveis de direcionamento inferiores aos dos seus equivalentes que não internalizam. Os dados de microscopia eletrónica aqui relatados demonstram que o mAb 806 internalizado é rapidamente transportado para lisossomas onde presumivelmente ocorre uma rápida degradação. Esta observação é consistente com a rápida expulsão de iodo da célula.

O anticorpo monoclonal L8A4 descrito anteriormente dirigido ao péptido de junção único que se encontra em EGFR de2-7, comporta-se de um modo semelhante ao mAb 806 (35). Utilizando células U87MG transfectadas com o EGFR de2-7, este anticorpo teve uma velocidade de internalização semelhante (35% a 1 hora em comparação com 30% a 1 hora para mAb 806) e apresentou um direcionamento *in vivo* comparável quando se utilizaram fibroblastos 3T3 transfectados com EGFR de2-7 (pico de 24% ID/g de tumor às 24 horas em comparação com 18% ID/g de tumor às 8 horas para mAb 806) (25). Interessantemente, a retenção *in vivo* deste anticorpo em xenoenxertos tumorais foi aumentada quando marcado com 5-iodo-3-piridinocarboxilato de N-succinimidilo (25). Este grupo prostético marcado tem carga positiva a pH lisossómico e tem assim maior retenção celular (33). A maior retenção é potencialmente útil quando se considera um anticorpo para radioimunoterapia e este método pode ser utilizado para melhorar a retenção do mAb 806 iodado ou fragmentos seus.

EXEMPLO 8

LIGAÇÃO DE mAb 806 A CÉLULAS CONTENDO EGFR AMPLIFICADO

Para examinar se o mAb 806 pode reconhecer o EGFR expresso em células contendo um gene do recetor amplificado, foi analisada a sua ligação a células A431. Tal como descrito anteriormente, as células A431 são células de carcinoma escamoso humano e expressam níveis elevados de wtEGFR. Uma ligação baixa, mas altamente reproduzível, de mAb 806 a células A431 foi observada através de análise FACS (**Figura 6**).

O anticorpo DH8.3 não se ligou a células A431, indicando que a ligação do mAb 806 não era o resultado de uma expressão de baixo nível ao EGFR de2-7 (**Figura 6**). Tal como esperado, o anticorpo anti-EGFR 528 mostrou uma forte coloração das células A431 (**Figura 6**). Dado este resultado, a ligação do mAb 806 a A431 foi caracterizada através de análise Scatchard. Ao mesmo tempo que a ligação do mAb 806 iodado era comparativamente baixa, foi possível obter dados consistentes para Scatchard. A média de tais experiências deu um valor para afinidade de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ com $2,4 \times 10^5$ recetores por célula. Assim, a afinidade para este recetor foi umas 10 vezes inferior à afinidade para com o EGFR de2-7. Para além disso, o mAb 806 parece reconhecer apenas uma pequena porção do EGFR que se encontra na superfície de células A431. Utilizando o anticorpo 528, os inventores mediram aproximadamente 2×10^6 recetores por célula o que está de acordo com numerosos outros estudos (26).

O reconhecimento do sEGFR de tipo selvagem pelo mAb 806 requer claramente alguma desnaturação do recetor para expor o epítopo. A extensão da desnaturação necessária é apenas ligeira uma vez que mesmo a absorção do sEGFR de tipo selvagem numa superfície plástica induziu uma ligação robusta do mAb 806 em ensaios ELISA. Uma vez que o mAb 806 se ligou apenas a aproximadamente 10% do EGFR à superfície das células A431, é tentador especular que este subconjunto de recetores possa ter uma conformação alterada semelhante à induzida pela truncagem EGFR de2-7. De facto, a expressão extremamente elevada do EGFR mediada pela amplificação do gene em células A431, pode fazer com que alguns recetores sejam processados incorretamente conduzindo a uma conformação alterada. Interessantemente, *immunoblotting* semiquantitativo de lisados de células A431 com mAb 806 mostrou que este poderia reconhecer a maioria dos recetores de EGF de A431 seguido de SDS-PAGE e transferência de Western. Este resultado apoia ainda o argumento de que o mAb 806 se liga a um subconjunto de recetores à superfície de células A431 que têm uma conformação alterada. Estas observações em células A431 são consistentes com os dados de imuno-histoquímica que demonstram que o mAb 806 se liga a gliomas contendo amplificação do gene de EGFR. Uma vez que a ligação do mAb 806 foi completamente negativa nas células U87MG parentais poderia parecer que este

fenómeno podia estar restrito a células contendo EGFR amplificado apesar do nível de receptor "desnaturado" à superfície de células U87MG poder estar abaixo do nível de deteção. No entanto, isto parece improvável uma vez que o mAb 806 iodado não se ligou a sedimentos de células U87MG contendo até 1×10^7 células.

EXEMPLO 9

DIRECIONAMENTO IN VIVO DE CÉLULAS A431 PELO mAb 806

Um segundo estudo de biodistribuição foi efetuado com o mAb 806 para determinar se podia alvejar xenoenxertos de tumor A431. O estudo foi conduzido durante um curso de tempo maior para se obter mais informação em relação ao direcionamento para xenoenxertos U87MG. 2-7 pelo mAb 806, que foram incluídos em todos os ratinhos como controlo positivo. Adicionalmente, o anticorpo 528 anti-EGFR foi incluído como controlo positivo para os xenoenxertos A431, uma vez que um estudo prévio demonstrou um direcionamento baixo mas significativo deste anticorpo para células A431 criadas em ratinhos nus (21).

Durante as primeiras 48 h, o mAb 806 apresentou propriedades de direcionamento quase idênticas às observadas nas experiências iniciais (**Figura 7A**) comparada com a **Figura 4A**). Em termos de % ID/g de tumor, os níveis de mAb 806 em xenoenxertos U87MG. 2-7 decaíram lentamente após 24 h mas permaneceram sempre mais elevados que os níveis detetados em tecido normal. A tomada nos xenoenxertos A431 foi comparativamente baixa, no entanto houve um pequeno aumento na % ID/g de tumor durante as primeiras 24 h não observado em tecidos normais tais como fígado, baço, rim e pulmão (**Figura 7A**). A tomada do anticorpo 528 foi muito baixa em ambos os xenoenxertos quando expressa como % ID/g de tumor (**Figura 7B**) parcialmente devido à eliminação mais rápida deste anticorpo do sangue. Em termos de razão de tumor para sangue o mAb 806 atingiu um pico às 72 h para os xenoenxertos U87MG. 2-7 e às 100 h para os xenoenxertos A431 **Figura 8A, B**). Ao mesmo tempo que a razão de tumor para sangue para o mAb 806 nunca superou 1,0 em relação ao tumor A431, aumentou ao longo de todo o tempo decorrido (**Figura 8B**) e foi mais elevada que todos os outros tecidos examinados (dados não mostrados) indicando baixos níveis de direcionamento.

A razão de tumor para sangue para o anticorpo 528 mostrou um perfil semelhante ao mAb 806 embora fossem observados níveis mais elevados nos xenoenxertos A431 (**Figura 8A, B**). O mAb 806 teve um pico da razão de tumor para fígado em xenoenxertos U87MG. 2-7 de 7,6, às 72 h, demonstrando claramente tomada preferencial nestes tumores em comparação com tecido normal (**Figura 8C**). Outras razões de tumor para órgão para o mAb 806 foram semelhantes às observadas no fígado (dados não mostrados). O pico da razão de tumor para fígado para o mAb 806 em xenoenxertos A431 foi de 2,0 às 100 h, indicando novamente uma ligeira tomada preferencial no tumor em comparação com tecido normal (**Figura 8D**).

EXEMPLO 10

ESTUDOS DE TERAPIA

Os efeitos do mAb 806 foram avaliados em dois modelos de xenoenxertos de doença - um modelo preventivo e um modelo de tumor estabelecido.

Modelos de Xenoenxerto

Consistente com relatórios anteriores (Nishikawa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(16); 7727-7731) células as U87MG transfectadas com EGFR de2-7 cresceram mais rapidamente que as células parentais e células U87MG transfectadas com o EGFR wt. Por essa razão, não foi possível criar ambos os tipos celulares nos mesmos ratinhos.

3×10^6 células tumorais em 100 ml de PBS foram inoculados subcutaneamente em ambos os flancos de ratinhos nus fêmea com 4-6 semanas de idade (Animal Research Centre, Western Australia, Austrália). A eficácia terapêutica do mAb 806 foi investigada em ambos os modelos preventivo e de tumor estabelecidos. No modelo preventivo, foram tratados intraperitonealmente 5 ratinhos com 2 xenoenxertos cada, com 1 ou 0,1 mg de mAb 806 ou veículo (PBS) a começar no dia antes da inoculação das células tumorais. O tratamento foi continuado durante um total de 6 doses, 3 vezes por semana durante 2 semanas. No modelo estabelecido, o tratamento foi iniciado quando os tumores tinham alcançado um volume médio de $65 \pm 6,42 \text{ mm}^3$ (U87MG. 2-7), $84 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ (U87MG), $73 \pm 7,5 \text{ mm}^3$ (U87MG.wtEGFR) ou $201 \pm 19,09 \text{ mm}^3$ (tumores A431). O volume

tumoral em mm^3 foi determinado utilizando a fórmula $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$, onde comprimento era o eixo mais longo e a largura a medição perpendicular ao comprimento (Scott et al., 2000). Os dados foram expressos como volume tumoral médio \pm EP para cada grupo de tratamento. A análise estatística foi efetuada a dados momentos utilizando o teste t de Student. Os animais foram sujeitos a eutanásia quando os xenoenxertos alcançaram um volume aproximado de 1,5 cm^3 e os tumores foram excisados para exame histológico. Este projeto de investigação foi aprovado pelo *Animal Ethics Committee of the Austin and Repatriation Medical Centre*.

Exame Histológico de Xenoenxertos Tumorais

Os xenoenxertos foram excisados e divididos ao meio. Metade foi fixada em formalina a 10%/PBS antes de ser impregnada em parafina. Secções de quatro micrómetros foram então cortadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para exame histológico de rotina. A outra metade foi embebida em composto Tissue Tek® OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), congelada em azoto líquido e armazenada a -80°C. Foram cortadas e fixadas secções finas de crióstato (5 micrómetros) em acetona gelada durante 10 min seguido de secagem ao ar durante mais 10 min. As secções foram bloqueadas em reagente de bloqueio de proteínas (Lipshaw Immunon, Pittsburgh E.U.A.) durante 10 min e depois incubadas com anticorpo primário biotinilado (1 mg/ml), durante 30 min à temperatura ambiente (TA). Todos os anticorpos foram biotinilados utilizando o módulo de biotinilação de proteínas ECL (Amersham, Baulkham Hills, Austrália), segundo as instruções do fabricante. Após lavagem com PBS, as secções foram incubadas com um complexo de estreptavidina-peroxidase de rábano durante mais 30 min (Silenus, Melbourne, Austrália). Após uma lavagem final com PBS as secções foram expostas a substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) (ácido acético 0,1 M, acetato de sódio 0,1 M, AEC 0,02 M (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)) na presença de peróxido de hidrogénio durante 30 min. As secções foram lavadas com água e contrastadas com hematoxilina durante 5 min e montadas.

Eficácia do mAb 806 no Modelo Preventivo

O mAb 806 foi examinado quanto à eficácia contra tumores U87MG e U87MG. 2-7 num modelo preventivo de xenoenxerto. O anticorpo ou veículo foi administrado i.p. no dia antes da inoculação do tumor e foi dado 3 vezes por semana durante 2 semanas. O mAb 806 não teve efeito no crescimento dos xenoenxertos U87MG parentais, que expressam o EGFR wt, a uma dose de 1 mg por injeção (**Figura 9A**). Em contraste, o mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos U87MG. 2-7 de um modo dependente da dose **Figura 9B**). No dia 20, quando os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio foi de $1637 \pm 178,98 \text{ mm}^3$ para o grupo de controlo, um $526 \pm 94,74 \text{ mm}^3$ estatisticamente menor para o grupo de 0,1 mg por injeção ($p < 0,0001$) e $197 \pm 42,06 \text{ mm}^3$ para o grupo de 1 mg por injeção ($p < 0,0001$). Os grupos de tratamento foram sacrificados no dia 24 momento ao qual os volumes tumorais médios foram de $1287 \pm 243,03 \text{ mm}^3$ para o grupo tratado com 0,1 mg e $492 \pm 100,8 \text{ mm}^3$ para o grupo de 1 mg.

Eficácia do mAb 806 no Modelo de Xenoenxerto Estabelecido

Dada a eficácia do mAb 806 no modelo preventivo de xenoenxerto, a sua capacidade para inibir o crescimento de xenoenxertos de tumores estabelecidos foi então examinada. O tratamento de anticorpo foi tal como descrito no modelo preventivo exceto que começou quando os tumores alcançaram um volume tumoral médio de $65 \pm 6,42 \text{ mm}^3$ para os xenoenxertos U87MG. 2-7 e de $84 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ para os xenoenxertos U87MG parentais. Novamente, o mAb 806 não teve efeito no crescimento dos xenoenxertos U87MG parentais a uma dose de 1 mg por injeção (**Figura 10A**). Em contraste, o mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos U87MG. 2-7 de um modo dependente da dose (**Figura 10B**). No dia 17, um dia antes dos animais de controlo serem sacrificados, o volume tumoral médio foi de $935 \pm 215,04 \text{ mm}^3$ para o grupo de controlo, $386 \pm 57,51 \text{ mm}^3$ para o grupo de 0,1 mg por injeção ($p < 0,01$) e $217 \pm 58,17 \text{ mm}^3$ para o grupo de 1 mg por injeção ($p < 0,002$).

Para examinar se a inibição do crescimento observada com o mAb 806 era restrita às células que expressavam EGFR de 2-7,

a sua eficácia contra xenoenxertos de tumores U87MG.wtEGFR foi examinada num modelo estabelecido. Estas células servem como modelo para tumores contendo amplificação do gene de EGFR sem expressão de EGFR de2-7. O tratamento de mAb 806 começou quando os tumores alcançaram um volume tumoral médio de $73 \pm 7,5 \text{ mm}^3$. O mAb 806 inibiu significativamente o crescimento dos xenoenxertos U87MG.wtEGFR estabelecidos quando comparados com tumores de controlo tratados com veículo (**Figura 10C**). No dia em que os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio foi de $960 \pm 268,9 \text{ mm}^3$ para o grupo de controlo e $468 \pm 78,38 \text{ mm}^3$ para o grupo tratado com injeções de 1 mg ($p<0,04$).

Análise Histológica e Imuno-histoquímica de Tumores Estabelecidos

Para avaliar potenciais diferenças histológicas entre os xenoenxertos U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR tratados com mAb 806 e de controlo (colhidos nos dias 24 e 42, respetivamente), fixados em formalina, secções impregnadas em parafina foram coradas com H&E. Foram observadas áreas de necrose em secções de xenoenxertos U87MG. 2-7 (colhidas 3 dias após o tratamento ter terminado) e U87MG.wtEGFR (colhidos 9 dias após o tratamento ter terminado) tratados com mAb 806. Este resultado foi consistentemente observado em vários xenoenxertos de tumores ($n=4$). No entanto, a análise das secções dos xenoenxertos tratados com controlo não mostra as mesmas áreas de necrose observadas com o tratamento de mAb 806. Secções de xenoenxertos U87MG tratados com mAb 806 ou controlo foram também coradas com H&E e não revelaram diferenças na viabilidade celular entre os dois grupos, apoiando ainda a hipótese de que a ligação do mAb 806 induz menor viabilidade celular/necrose dentro dos xenoenxertos tumorais.

Foi efetuada uma análise imuno-histoquímica de secções de xenoenxertos U87MG, U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR para determinar os níveis de expressão de EGFR wt e de2-7 após tratamento com mAb806. As secções foram colhidas nos dias 24 e 42 como acima e foram imunocoradas com o anticorpo 528 ou 806. Tal como esperado o anticorpo 528 corou todas as secções de xenoenxerto sem diminuição óbvia na intensidade entre os tumores tratados e os de controlo. A coloração de secções de U87MG não foi detetável com o mAb 806, no entanto foi observada coloração

positiva de secções dos xenoenxertos U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR. Não houve diferença na densidade da coloração do mAb 806 entre os xenoenxertos U87MG. 2-7 e U87MG.wtEGFR de controlo e tratados sugerindo que o tratamento com anticorpo não regula negativamente a expressão de EGFR de 2-7 nem wt.

Tratamento de Xenoenxertos A431 com mAb 806

Para demonstrar que os efeitos antitumoriais do mAb 806 não eram restritos a células U87MG, o anticorpo foi administrado a ratinhos com xenoenxertos A431. Estas células contêm um gene de EGFR amplificado e expressam aproximadamente 2×10^6 receptores por célula. Tal como descrito acima, o mAb 806 liga-se a cerca de 10% destes EGFR e alveja os xenoenxertos A431. O mAb 806 inibiu significativamente o crescimento dos xenoenxertos A431 quando examinado no modelo preventivo de xenoenxerto anteriormente descrito (**Figura 11A**). No dia 13, quando os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio foi de $1385 \pm 147,54 \text{ mm}^3$ no grupo de controlo e $260 \pm 60,33 \text{ mm}^3$ para o grupo de tratamento de injeção de 1 mg ($p < 0,0001$).

Numa experiência em separado, uma dose de mAb de 0,1 mg também inibiu significativamente o crescimento dos xenoenxertos A431 num modelo preventivo.

Dada a eficácia do mAb 806 no modelo preventivo de xenoenxerto A431, foi examinada a sua capacidade para inibir o crescimento de xenoenxertos de tumores estabelecidos. O tratamento com anticorpo foi tal como descrito no modelo preventivo exceto que não foi iniciado até os tumores terem alcançado um volume tumoral médio de $201 \pm 19,09 \text{ mm}^3$. O mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos de tumores estabelecidos (**Figura 11B**). No dia 13, quando os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio foi de $1142 \pm 120,06 \text{ mm}^3$ para o grupo de controlo e $451 \pm 65,58 \text{ mm}^3$ para o grupo de injeção de 1 mg ($p < 0,0001$).

Em resumo, os estudos de terapia com mAb 806 aqui descritos demonstraram claramente uma inibição dependente da dose do crescimento do xenoenxerto U87MG. 2-7. Em contraste, não foi observada inibição dos xenoenxertos U87MG parentais

apesar do facto de continuarem a expressar o EGFR wt *in vivo*. O mAb 806 não só reduziu significativamente o volume do xenoenxerto como também induziu necrose significativa dentro do tumor. Este é o primeiro relatório mostrando a utilização terapêutica com sucesso de um tal anticorpo *in vivo* contra xenoenxertos de glioma expressando EGFR de2-7 humano.

A amplificação génica do EGFR foi relatada em vários tumores diferentes e é observada em aproximadamente 50% do gliomas (Voldberg et al., 1997). Foi proposto que a subsequente sobre-expressão de EGFR mediada pela amplificação do gene do recetor pode conferir uma vantagem de crescimento através do aumento da sinalização intracelular e do crescimento celular (Filmus et al., 1987). A linha celular U87MG foi transfetada com o EGFR wt para produzir uma célula de glioma que imita o processo de amplificação do gene de EGFR. O tratamento de xenoenxertos U87MG.wtEGFR estabelecidos com mAb 806 resultou numa significativa inibição do crescimento. Assim, o mAb 806 medeia também a atividade antitumoral *in vivo* contra células contendo amplificação do gene de EGFR. Interessantemente, a inibição do mAb 806 dos xenoenxertos U87MG.wtEGFR parece ser menos eficaz que a observada com os tumores U87MG. 2-7. Isto provavelmente reflete o facto de o mAb 806 ter uma afinidade menor para o EGFR amplificado e apenas se ligar a uma pequena proporção de recetores expressos à superfície da célula. No entanto, deve notar-se que apesar do pequeno efeito nos volumes dos xenoenxertos U87MG.wtEGFR, o tratamento com mAb 806 produziu grandes áreas de necrose dentro destes xenoenxertos. Para excluir a possibilidade do mAb 806 mediar apenas a inibição das linhas celulares derivadas de U87MG testámos a sua eficácia contra xenoenxertos A431. Esta linha celular derivada de carcinoma de células escamosas contém uma amplificação significativa do gene de EGFR que é mantida tanto *in vitro* como *in vivo*. O tratamento dos xenoenxertos A431 com mAb 806 produziu uma significativa inibição do crescimento tanto no modelo preventivo como no estabelecido, indicando que os efeitos antitumorais do mAb 806 não estão restringidos às linhas celulares U87MG transfetadas.

EXEMPLO 11**TRATAMENTO DE TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE XENOENXERTOS A431 COM mAb806 e AG1478**

Os efeitos antitumorais do mAb 806 combinados com AG1478 foram testados em ratinhos com xenoenxertos A431. O AG1478 (4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) é um inibidor potente e seletivo da EGFR-quinase *versus* HER2-neu e o recetor quinase do fator de crescimento derivado de plaquetas (Calbiochem N.º Cat. 658552). Foram incluídos três controlos: tratamento apenas com veículo, veículo + apenas mAb 806 e veículo + apenas AG1478. Os resultados são ilustrados na **Figura 12**. Foram administrados 0,1 mg de mAb 806 no dia 1 antes do xenoenxerto e nos dias 1, 3, 6, 8 e 10 após o xenoenxerto. Foram administrados 400 µg de AG1478 nos dias 0, 2, 4, 7, 9 e 11 após o xenoenxerto.

Tanto AG1478 como mAb806, quando administrados sozinhos produziram uma redução significativa do volume do tumor. No entanto, em combinação, a redução do volume do tumor foi grandemente aumentada.

Adicionalmente, a ligação do mAb806 ao EGFR das células A431 foi avaliada na ausência e presença de AG1478. As células foram colocadas em meio sem soro de um dia para o outro, depois tratadas com AG1478 durante 10 min a 37°C, lavadas duas vezes em PBS depois lisadas em Triton a 1% e foram preparados lisados. Os lisados foram preparados tal como descrito no Exemplo 20 aqui. O lisado foi então avaliado quanto à reatividade com 806 através de um ELISA numa versão modificada de um ensaio descrito por Schooler e Wiley, *Analytical Biochemistry* 277: 135-142, 2000. As placas foram revestidas com 10 µg/ml de mAb 806 em PBS/EDTA de um dia para o outro à temperatura ambiente e depois lavadas duas vezes. As placas foram então bloqueadas com albumina do soro a 10%/PBS durante 2 horas a 37°C e lavadas duas vezes. Foi adicionado lisado celular 1:20 em albumina do soro a 10%/PBS durante 1 hora a 37°C, depois foram lavadas quatro vezes. Anti-EGFR (SC-03 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)) em albumina do soro a 10%/PBS reagiu 90 min à temperatura ambiente, as placas foram lavadas quatro vezes e foi adicionado anti-coelho-HRP (1:2000 se

proveniente de Silenus) em albumina do soro a 10%/PBS durante 90 min à temperatura ambiente, foram lavadas quatro vezes e a cor foi revelada utilizando ABTS como substrato. Verificou-se que a ligação do mAb 806 é significativamente aumentada na presença de quantidades crescentes de AG1478 (**Figura 13**).

EXEMPLO 12

IMUNORREATIVIDADE EM GLIOBLASTOMAS HUMANOS PRÉ-TIPIFICADOS QUANTO AO STATUS DE EGFR

Dada a elevada incidência de expressão, amplificação e mutação de EGFR, em glioblastomas, foi efetuado um estudo imuno-histoquímico detalhado estudo para avaliar a especificidade de 806 em tumores para além dos xenoenxertos. Um painel de 16 glioblastomas foi analisado através de imuno-histoquímica. Este painel de 16 glioblastomas foi pré-tipificado por RT-PCR quanto à presença de EGFR de tipo selvagem amplificado e expressão de EGFR de 2-7. Seis destes tumores expressavam apenas o transcrito de EGFR wt, 10 tinham amplificação do gene de EGFR wt com 5 destes mostrando apenas transcritos de EGFR wt e 5 transcritos tanto do gene de EGFR de tipo selvagem como de 2-7. A análise imuno-histoquímica foi efetuada utilizando secções de 5 mm de tecido fresco congelado aplicadas em lâminas de histologia e fixadas durante 10 minutos em acetona fria. O anticorpo primário ligado foi detetado com anticorpo de cavalo anti-ratinho biotinilado seguido de uma reação de complexo avidina-biotina. Foi utilizado tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) como cromogénio. A extensão da reatividade imuno-histoquímica em tecidos foi estimada através de microscopia ótica e graduada de acordo com o número de células imunorreativas em aumentos de 25% como se segue:

Focal = menos de 5%

+ = 5-25%

++ = 25-50%

+++ = 50-75%

++++ => 75%

O anticorpo 528 mostrou intensa reatividade em todos os tumores, ao mesmo tempo que a imunocoloração de DH8.3 foi

restringida aos tumores expressando o EGFR de2-7 (**Tabela 2**). Consistente com as observações anteriores em FACS e ensaios de roseta, o mAb 806 não reagiu com os glioblastomas expressando o transcrito de wtEGFR de genes de EGFR não amplificados (**Tabela 2**). Este padrão de reatividade para mAb 806 é semelhante ao observado nos estudos de xenoenxertos e sugere novamente que este anticorpo reconhece o EGFR de2-7 e amplificado mas não o wtEGFR quando expresso à superfície celular.

TABELA 2

Imunorreatividade dos mAb 528, DH8.3 e 806 em glioblastomas pré-tipificados quanto à presença de EGFR de tipo selvagem e EGFR de2-7 mutado e quanto ao seu *status* de amplificação.

Amplificação	<u>Expressão de EGFR de2-7</u>	528	DH8.3	806
Não	Não	++++	-	-
	Não	++++	-	-*
	Não	++++	-	-
	Não	++	-	-
	Não	+++	-	-
	Não	++++	-	-
	Sim	Não	++++	-
	Sim	Não	++++	-
	Sim	Não	++++	-
	Sim	Não	++++	-
Sim	Não	++++	-	++++
	Não	++++	-	+
	Não	++++	-	+++
	Não	++++	-	++++
	Não	++++	-	+++++
	Sim	Sim	++++	++++
	Sim	Sim	++++	++++
	Sim	Sim	++++	++++
	Sim	Sim	++++	++++
	Sim	Sim	++	++

*coloração focal

EXEMPLO 13

IMUNORREATIVIDADE DE EGFR EM TECIDO NORMAL

Para determinar se o EGFR de2-7 é expresso em tecido normal, foi conduzido um estudo de imuno-histoquímica com mAb 806 e DH8.3 num painel de 25 tecidos. Não houve

imunorreatividade forte nem com mAb 806 nem com DH8.3 em nenhum dos tecidos testados sugerindo que o EGFR de2-7 está ausente nos tecidos normais (**Tabela 3**). Houve alguma coloração variável presente nas amígdalas com o mAb 806 que ficou restringida à camada de células basais da epiderme e células escamosas da mucosa do epitélio. Em placenta, foi observada imunocoloração ocasional do epitélio do trofoblasto. Interessantemente, dois tecidos que expressam elevados níveis endógenos de wTEGFR, o fígado e a pele, não conseguiram mostrar qualquer reatividade significativa do mAb 806. Não foi observada nenhuma reatividade com as amostras de fígado e foi ocasionalmente detetada apenas uma reatividade focal fraca e inconsistente (em não mais de 10% de todas as amostras estudadas) em queratinócitos basais em amostras de pele e no epitélio escamoso da mucosa da amígdala, demonstrando ainda que este anticorpo não se liga ao wTEGFR expresso à superfície das células numa extensão significativa (**Tabela 3**). Todos os tecidos foram positivos para o wTEGFR tal como evidenciado pela coloração universal observada com o anticorpo 528 (**Tabela 3**).

TABELA 3

Reatividade de 582, DH8.3 e 806 em tecidos normais.

TECIDO	528	DH8-3	806
Esófago	pos	—	—
Estômago	pos	—	—
Duodeno	pos	—	—
Intestino delgado/ duodeno	pos	—	—
Côlon	pos	—	—
Fígado	pos	—	—
Glând. salivares (parótida)	pos	—	—
Rim	pos	—	—
Bexiga	pos	—	—
Próstata	pos	—	—
Testículo	pos	—	—
Útero (cx/endom)	pos	—*	—
Trompa de Falópico	pos	—	—
Ovário	pos	—	—
Mama	pos	—*	—
Placenta	pos	—	—
Nervo periférico	pos	—	—
Músculo-esquelético	pos	—	—
Tiroide	pos	—	—
Nódulo linfático	pos	—	—
Baço	pos	—	—
Amígdala	pos	—	— reatividade ocasional fraca da camada basal do epitélio escamoso
Coração	pos	—	—
Pulmão	pos	—	—
Pele	pos	—	— reatividade ocasional fraca da camada basal do epitélio escamoso

*Alguma coloração do estroma em vários tecidos

EXEMPLO 14**IMUNOREATIVIDADE DE EGFR EM VÁRIOS TUMORES**

A extensão do EGFR de 2-7 outros tipos de tumores foi examinada utilizando um painel de 12 malignidades diferentes. O anticorpo 528 mostrou frequentemente coloração homogénea em muitos tumores analisados exceto melanoma e seminoma. Quando

presente, a imunorreatividade de DH8.3 ficou restrita à célula tumoral focal ocasional indicando que há pouca se houver alguma expressão de EGFR de 2-7 em tumores fora do cérebro utilizando este sistema de deteção (**Tabela 4**). Houve também coloração focal dos vasos sanguíneos e uma coloração difusa variável do tecido conjuntivo com o anticorpo DH8.3 nalguns tumores (**Tabela 4**). Esta coloração era fortemente dependente da concentração de anticorpo utilizada e foi considerada reatividade de fundo inespecífica. O mAb 806 mostrou coloração positiva em 64% dos tumores da cabeça e pescoço e 50% dos carcinomas do pulmão (**Tabela 4**). Houve pouca reatividade do mAb 806 noutrios locais exceto nos tumores urinários que foram positivos em 30% dos casos. Uma vez que os cancros da cabeça e pescoço e do pulmão foram negativos para o anticorpo DH8.3 a reatividade observada com o mAb nestes tumores pode estar associada a amplificação do gene de EGFR.

TABELA 4

Anticorpos monoclonais 528, DH8.3 e 806 no painel de tumores.

Tumor	528	DH8.3	806
Metástases de melanoma maligno	0/10	0/10	0/10
Bexiga (tcc, sqcc, adeno)	10/10 (7x++++, 2x++, 1x+)	0/10*	3/10* (2x++++, 1x++)
Glândula mamária	6/10 (3x++++, 3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
Cancro da cabeça + pescoço (sqcc)	11/11 1x++ - 10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++, 3x++, 1x+)
Pulmão (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 10x++++-1x++)	0/12*	6/12 (3x++++ 3x++)
Leiomiossarcoma	5/5 (4x++++, 1x+)	0/5	0/5
Lipossarcoma	5/5 (2x + 3x ++)	0/5	0/5*
Sarcoma sinovial	4/5* (4x +++)	0/5	0/5*
Histiocitoma fibroso maligno Mfh	4/5*	0/5*	0/5*
Carcinoma do cólon	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
Seminoma	1/10*	1/10*	0/10
Ovário (papilar seroso)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5

*coloração focal

EXEMPLO 15**IMUNORREATIVIDADE EM GLIOBLASTOMAS HUMANOS NÃO SELECCIONADOS PELO STATUS DE EGFR**

Para confirmar a especificidade única e para avaliar a reatividade do mAb 806, este foi comparado com os anticorpos 528 e DH8.3 num painel de 46 glioblastomas não pré-selecionados quanto ao seu status de EGFR. O anticorpo 528 foi fortemente e homogeneamente positivo em todas as amostras exceto duas (N.º 27 e 29) (44/46, 95,7%). Estes dois casos foram também negativos para mAb806 e mAb DH8.3. O mAb 806 foi positivo em 27/46 (58,7%) casos, 22 dos quais apresentaram imunorreatividade homogénea em mais de 50% do tumor. O anticorpo DH8.3 foi positivo em 15/46 (32,6%) glioblastomas, 9 dos quais mostraram imunorreatividade homogénea. A coloração imuno-histoquímica destes tumores não selecionados é tabelada na **Tabela 5**.

Houve concordância entre o mAb 806 e DH8.3 em todos os casos exceto um (N.º 35).

Foi feita uma análise molecular quanto à presença de amplificação de EGFR em 44 casos (**Tabela 5**). Destes, 30 casos co-tipificaram com o padrão de imunorreatividade de mAb 806 anteriormente estabelecido: p.ex. 16 casos negativos para mAb 806 não revelaram amplificação de EGFR e 14 casos de EGFR amplificado foram também imunopositivos para mAb 806. No entanto, 13 casos, que mostraram imunorreatividade com 806, foram negativos quanto à amplificação de EGFR ao mesmo tempo que 1 caso de EGFR amplificado foi negativo para mAb 806. Mais análise do status da mutação destes casos de amplificação negativa e positivos para 806 é descrita abaixo e proporciona uma explicação para a maioria dos 13 casos que foram negativos para amplificação de EGFR e foram reconhecidos por 806.

Subsequentemente, foi efetuada uma análise molecular da mutação de deleção por RT-PCR em 41/46 casos (**Tabela 5**). Destes, 34 casos co-tipificaram com DH8.3 específico para a mutação de deleção: 12 casos foram positivos tanto em RT-PCR como em imuno-histoquímica e 22 casos foram negativos/negativos. Três casos (#2, #34, #40) foram positivos

para DH8.3/negativos em RT-PCR para a mutação de deleção e três casos (#12, #18, #39) foram negativos para DH8.3/positivos em RT-PCR. Tal como esperado com base na nossa análise de especificidade anterior, imunorreatividade com mAb 806 foi observada em todos os tecidos positivos para DH8.3 exceto num caso (#35).

O caso #3 revelou também uma mutação (designada A2 na **Tabela 5**), que incluiu as sequências da mutação de2-7 mas esta não pareceu ser a deleção de2-7 clássica com perda das 801 bases (dados não mostrados). Este caso foi negativo para reatividade com DH8.3 mas mostrou reatividade com 806, indicando que 806 pode reconhecer uma mutação adicional e possivelmente única de EGFR.

TABELA 5

Análise imuno-histoquímica de 46 glioblastomas não selecionados com os mAb 528, 806 e DH8.3

#	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (det.)	neg.	N	A2
4	++++	++++	neg.	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	neg.	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	A	5' MUT
9	++++	++++	neg.	A	WT
10	++++	neg.	neg.	N	WT
11	++	++	++	A	5' MUT
12	++++	++	neg.	A	5' MUT
13	++++	++++	neg.	N	WT
14	++	neg.	neg.	Nd	nd
15	++	++	neg.	N	WT
16	+	neg.	neg.	N	nd
17	++++	neg.	neg.	N	WT
18	++++	++++	neg.	A	5' MUT
19	++++	++++	neg.	N	WT
20	++++	neg.	neg.	N	WT
21	++++	++++	neg.	N	WT
22	+++	neg.	neg.	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	neg.	A	WT

25	++++	neg.	neg.	N	WT
26	++++	++++	+++	A	5' MUT
27	neg.	neg.	neg.	N	WT
28	+++	neg.	neg.	N	WT
29	neg.	neg.	neg.	N	WT
30	++++	++++	neg.	N	WT
31	++++ par det	neg.	neg.	N	nd
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	neg.	++++	A	5' MUT
36	+++	++	+++	A	5' MUT
37	++++	+	+	A	5' MUT
38	++++	neg.	neg.	N	WT
39	++	neg.	neg.	N	5' MUT
40	++++	++++	+	A	WT
41	++	neg.	neg.	N	WT
42	++++	++++	neg.	A	WT
43	++++	neg.	neg.	nd	nd
44	++++	neg.	neg.	N	WT
45	++++	neg.	neg.	N	WT
46	++++	neg.	neg.	N	nd

* N = não amplificado, A - amplificado,
 +WT = tipo selvagem, 5'-mut
 nd = não realizado

A reatividade do anticorpo 806 co-tipificou com EGFR amplificado ou mutante de2-7 em 19/27 ou mais de 70% dos casos. É notável que 2 destes 8 casos foram também reativos com DH8.3.

EXEMPLO 16

TRATAMENTO SISTÉMICO E ANÁLISE DE TUMORES GLIOMA INTRACRANIANOS

Para testar a eficácia do anticorpo monoclonal anti-EGFR, mAb 806, tratámos ratinhos nus possuindo xenoenxertos de glioma que sobre-expressam EGFR com injeções intraperitoneais de mAb806, o controlo do isotipo IgG ou PBS.

As linhas celulares de glioblastoma humanas U87MG, LN-Z308 e A1207 (oferta do Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) foram infetadas com vírus EGFR, EGFR

deficiente em quinase (DK) ou EGFR de tipo selvagem (wtEGFR). As populações expressando níveis elevados semelhantes de EGFR foram selecionadas através de separação de células ativada com fluorescência e designadas como U87MG. EGFR, U87MG.DK, U87MG.wtEGFR, LN-Z308. EGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308, wtEGFR, A1207. EGFR, A1207.DK e A1207.wtEGFR, respetivamente. Cada uma foi mantida em meio contendo G418 (linhas celulares U87MG, 400 µg/ml; linhas celulares LN-Z308 e A1207, 800 µg/ml).

As células U87MG. EGFR foram implantadas intracranianamente em ratinhos nus e os tratamentos começaram no mesmo dia. 10^5 células em 5 µl de PBS foram implantadas no corpo estriado direito dos cérebros de ratinhos nus. A terapia sistémica com mAb 806 ou o controlo do isotipo IgG2b, foi alcançada através de injeção i.p. de 1 mg de mAb num volume de 100 µl dia sim, dia não desde o dia 0 pós-implantação até ao dia 14. Para terapia direta dos tumores U87MG. EGFR intracerebrais, foram injetados 10 µg de mAb 806 ou do controlo do isotipo IgG2b, num volume de 5 µl no local de injeção do tumor dia sim, dia não a começar no dia 1 durante 5 dias.

Os animais tratados com PBS ou IgG de controlo do isotipo tiveram uma sobrevida mediana de 13 dias, enquanto os ratinhos tratados com mAb 806 tiveram um aumento de 61,5% na sobrevida mediana até aos 21 dias ($P<0,001$).

O tratamento de ratinhos 3 dias pós-implantação, após estabelecimento do tumor, também prolongou a sobrevida mediana dos animais tratados com mAb 806 em 46,1% (de 13 dias a 19 dias; $P<0,01$) em comparação com a dos grupos de controlo.

Para determinar se estes efeitos antitumorais do mAb 806 se estendiam para além dos xenoenxertos U87MG. EGFR, foram administrados tratamentos semelhantes a animais possuindo xenoenxertos de células de glioma LN-Z308. EGFR e A1207. EGFR. A sobrevida mediana dos ratinhos tratados com mAb 806 possuindo xenoenxertos LN-Z308. EGFR foi prolongada de 19 dias para os controlos para 58 dias ($P<0,001$). Notavelmente, quatro dos oito animais tratados com mAb 806 sobreviveram para além de 60 dias. A sobrevida mediana dos animais possuindo

xenoenxertos A1207. EGFR foi também prolongada de 24 dias para os controlos para 29 dias ($P<0,01$).

O Tratamento com mAb 806 Inibe o Crescimento de Tumores Cerebrais que Sobre-expressam EGFR

Ratinhos possuindo xenoenxertos U87MG. EGFR e LN-Z308. EGFR foram sujeitos a eutânia no dia 9 e dia 15, respetivamente. Secções dos tumores foram histopatologicamente analisadas e os volumes dos tumores foram determinados. Consistente com os resultados observados para a sobrevivência animal, o tratamento com mAb 806 reduziu significativamente os volumes em cerca de 90% dos xenoenxertos U87MG. EGFR ($P<0,001$) e LN-Z308. EGFR em mais de 95% ($P<0,001$) em comparação com os grupos de controlo. Foram obtidos resultados semelhantes para animais possuindo tumores A1207. EGFR (redução do volume em 65%, $P<0,01$).

O Tratamento Intratumoral com mAb 806 Prolonga a Sobrevivência de Ratinhos Possuindo Tumores Cerebrais U87MG. EGFR

Foi também determinada a eficácia de injeção intratumoral direta do mAb 806 para o tratamento de xenoenxertos U87MG. EGFR. Foram dadas aos animais injeções intratumorais de mAb 806 ou IgG de controlo do isotipo um dia após a implantação. Os animais de controlo sobreviveram durante 15 dias, enquanto os ratinhos tratados com mAb 806 permaneceram vivos durante 18 dias ($P<0,01$). Embora o tratamento intratumoral com mAb 806 tenha sido de algum modo eficaz, implicou as dificuldades de múltiplas injeções intracranianas e maior risco de infecção. Por essa razão centrámo-nos nos tratamentos sistémicos para mais estudos.

O Tratamento com mAb 806 Prolonga Ligeiramente a Sobrevivência de Ratinhos Possuindo Xenoenxertos Intracranianos U87MG.wtEGFR mas não U87MG nem U87MG.DK

Para determinar se a inibição do crescimento através de mAb 806 era seletiva para tumores expressando EGFR, utilizámos animais possuindo xenoenxertos cerebrais U87MG, U87MG.DK (EGFR deficiente em quinase) e U87MG.wtEGFR. O tratamento com mAb 806 não prolongou a sobrevivência dos ratinhos implantados

com tumores U87MG que expressavam um baixo nível de EGFR de tipo selvagem endógeno (wtEGFR) nem de animais possuindo xenoenxertos U87MG.DK que sobre-expressam um EGFR deficiente em quinase, para além de um baixo nível de wtEGFR endógeno. O tratamento com mAb 806 prolongou ligeiramente a sobrevivência de ratinhos possuindo tumores U87MG.wtEGFR ($P<0,05$, sobrevivência mediana de 23 dias *versus* 26 dias para os grupos de controlo) que sobre-expressam wtEGFR.

A Reatividade de MAb 806 Correlaciona-se com Eficácia Antitumoral *In Vivo*

Para compreender o efeito diferencial do mAb 806 em tumores expressando vários níveis ou diferentes tipos de EGFR, determinámos a reatividade do mAb 806 com várias células tumorais através de análise FACS. Consistente com relatórios anteriores, o anticorpo monoclonal anti-EGFR 528 reconheceu tanto EGFR como wtEGFR e demonstrou uma colocação mais forte para as células U87MG. EGFR em comparação com as células U87MG. Em contraste, o anticorpo EGFR.1 reagiu com wtEGFR mas não com EGFR, uma vez que as células U87MG. EGFR foram tão fracamente reativas quanto as células U87MG. Este anticorpo EGFR.1 reagiu com U87MG.wtEGFR mais intensamente que com as células U87MG, uma vez que as células U87MG.wtEGFR sobre-expressam wtEGFR. Embora o mAb 806 tenha reagido intensamente com as células U87MG. EGFR e U87MG.DK e não com as células U87MG, reagiu fracamente com U87MG.wtEGFR, indicando que o mAb 806 é seletivo para EGFR com uma fraca reatividade cruzada para o wtEGFR sobre-expresso. Este nível de reatividade com U87MG.wtEGFR foi quantitativamente e qualitativamente semelhante ao prolongamento da sobrevivência mediado pelo tratamento com o anticorpo.

Determinámos também a especificidade do mAb 806 através de imunoprecipitação. Os EGFR em várias linhas celulares foram imunoprecipitados com anticorpo 528, EGFR.1 e mAb 806. As membranas de proteínas separadas eletroforeticamente foram então sondadas com o anticorpo anti-EGFR, C13, que reconhece wtEGFR bem como EGFR e DK. Consistente com a análise FACS o anticorpo 528 reconheceu os receptores wtEGFR e mutante, enquanto o anticorpo EGFR.1 reagiu com wtEGFR mas não com a espécie mutante. Para além disso, os níveis de receptores

mutantes em células U87MG. EGFR e U87MG.DK são comparáveis aos de wtEGFR nas células U87MG.wtEGFR. No entanto, o anticorpo mAb 806 foi capaz de precipitar apenas uma pequena quantidade do wtEGFR a partir dos lisados celulares de U87MG.wtEGFR em comparação com a quantidade maior de recetor mutante precipitada a partir de células U87MG. EGFR e U87MG.DK e uma quantidade indetectável a partir das células U87MG. Coletivamente, estes dados sugerem que o mAb 806 reconhece um epítopo em EGFR que ~~também~~ existe numa pequena fração de wtEGFR apenas quando é sobre-expresso à superfície celular.

O Tratamento com mAb 806 Reduz a Autofosforilação de EGFR e Regula Negativamente a Expressão de Bcl.X_L em Tumores Cerebrais U87MG. EGFR

Investigámos depois os mecanismos subjacentes à inibição do crescimento por mAb 806. Uma vez que a atividade de quinase constitutivamente ativa e a autofosforilação do terminal carboxilo de EGFR são essenciais para as suas funções biológicas determinámos o status de fosforilação de EGFR em tumores de animais tratados e de controlo. Verificou-se que o tratamento com mAb 806 reduziu dramaticamente a autofosforilação de EGFR, apesar dos níveis do recetor serem apenas ligeiramente menores nos xenoenxertos tratados com mAb 806. Mostrámos anteriormente que a autofosforilação do recetor causa regulação positiva do gene anti-apoptótico, Bcl-X_L, que tem um papel chave na redução da apoptose de tumores que sobre-expressam EGFR. Por essa razão, determinámos a seguir o efeito do tratamento com mAb 806 na expressão de Bcl-X_L. Os tumores com EGFR de animais tratados com mAb 806 mostraram de facto níveis reduzidos de Bcl-X_L.

O Tratamento com mAb 806 Diminui o Crescimento e a Angiogénese e Aumenta a Apoptose em Tumores U87MG. EGFR

À luz da supressão *in vivo* causada pelo tratamento com mAb 806 e pelos seus efeitos bioquímicos na sinalização do recetor, determinámos a velocidade de proliferação de tumores de ratinhos de controlo ou tratados. O índice proliferativo, medido através de coloração de Ki-67 dos tumores tratados com mAb 806, foi significativamente inferior aos dos tumores de controlo ($P < 0,001$). Adicionalmente, a análise do índice

apoptótico através de coloração TUNEL demonstrou um aumento significativo no número de células apoptóticas em tumores tratados com mAb 806 em comparação com os tumores de controlo ($P < 0,001$). A extensão da vascularização tumoral foi também analisada através de imunocoloração de tumores de espécimes tratados e de controlo para CD31. Para quantificar a vascularização tumoral, foram medidas áreas microvasculares (MVA) utilizando análise computorizada de imagem. Os tumores tratados com mAb 806 mostraram 30% menos MVA que os tumores de controlo ($P < 0,001$). Para compreender se a interação entre o recetor e o anticorpo pode desencadear uma resposta inflamatória, corámos secções tumorais quanto ao marcador de macrófagos, F4/80 e o marcador de células NK, asialo GM1. Os macrófagos foram identificados ao longo da matriz tumoral e especialmente acumulados em torno da periferia do tumor U87MG. EGFR tratado com mAb 806. Observámos pouca células NK infiltradas e em torno dos tumores e não observámos diferença significativa entre os tumores tratados com mAb 806 e com controlo do isotipo.

EXEMPLO 17

IMUNOTERAPIA DE COMBINAÇÃO COM mAb806 E mAb528

De certeza que isto funciona? O exemplo está num formato de algum modo diferente dos outros que o antecedem.

As experiências aqui expostas descrevem o trabalho *in vivo* desenhado para determinar a eficácia dos anticorpos de acordo com este invento.

Foram utilizados ratinhos nus fêmea, 4-6 semanas de idade, como animais experimentais. Os ratinhos receberam inoculações subcutâneas de 3×10^6 células tumorais em cada um dos flancos.

Os animais receberam células U87MG.D2-7, U87MG.DK ou A431, todas as quais estão descritas *supra*. A terapia começou quando os tumores cresceram até um tamanho suficiente.

Os ratinhos receberam então injeções de um de (i) solução salina tamponada com fosfato, (ii) mAb 806 (0,5 mg/injeção), (iii) mAb 528 (0,5 mg/injeção) ou (iv) uma combinação de ambos

os mAb. Em relação a "(iv)", os diferentes grupos de ratinhos receberam 0,5 mg/injeção de cada mAb ou 0,25 mg/injeção de cada mAb.

O primeiro grupo de ratinhos examinado foi daqueles que receberam injeções de U87MG.D2-7 injeções. O protocolo de tratamento começou 9 dias após a inoculação e continuou, 3 vezes por semana durante 2 semanas (i.e., os animais foram inoculados 9, 11, 13, 16, 18 e 20 dias após serem injetados com as células). No início do protocolo de tratamento, o diâmetro médio do tumor foi de 115 mm³. Cada grupo continha 50 ratinhos, cada um com dois tumores.

Dentro do grupo de ratinhos que receberam a combinação de anticorpos (0,5 mg/injeção de cada), houve três regressões completas. Não houve regressões em nenhum dos outros grupos. A **Figura 18A** mostra os resultados graficamente.

Num segundo grupo de ratinhos os materiais injetados foram os mesmos exceto que a terapia de combinação continha 0,25 mg de cada anticorpo por injeção. As injeções foram dadas 10, 12, 14, 17, 19 e 21 dias após a inoculação com as células. No início da terapia o tamanho médio dos tumores foi de 114 mm³. Os resultados são mostrados na **Figura 18B**.

O terceiro grupo de ratinhos recebeu inoculações de U87MG.DK. As injeções terapêuticos iniciaram-se 18 dias após a inoculação com as células e continuou nos dias 20, 22, 25, 27 e 29. O tamanho tumoral médio no início do tratamento foi de 107 mm³. A **Figura 18C** resume os resultados. As injeções terapêuticas foram as mesmas que no primeiro grupo.

Finalmente, o quarto grupo de ratinhos, que foi inoculado com células A431, recebeu injeções como nos grupos I e III, aos 8, 10, 12 e 14 dias após inoculação. No início, o tamanho tumoral médio foi de 71 mm³. Os resultados são mostrados na **Figura 18D**.

Os resultados indicaram que a terapia de combinação de anticorpos mostrou um efeito sinérgico na redução de tumores. Ver **Figura 18A**. Um efeito semelhante foi observado a uma dose

inferior, como na **Figura 18B**, indicando que o efeito não é simplesmente devido aos níveis de dosagem.

A terapia de combinação não inibiu o crescimento de U87MG.DK (**Figura 18C**), indicando que a função imunitária do anticorpo não era a causa para a diminuição observada nas **Figuras 18A e 18B**.

Nota-se que, tal como mostrado na **Figura 18D**, a terapia de combinação exibiu também eficácia sinérgica em tumores A431, com 4 doses a conduzirem a uma taxa de resposta 60% completa. Estes dados sugerem que a molécula EGFR reconhecida por mAb806 é funcionalmente diferente da inibida por 528.

Referências

1. Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., e Bigner, D. D. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII, *Cancer Res.* 57: 4130-40, 1997.
2. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., e Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer, *Br J Cancer.* 82: 186-94, 2000.
3. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., e et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas, *Cancer Res.* 55: 3140-8, 1995.
4. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundaresan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., e Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas, *Cancer Res.* 53: 3217-20, 1993.
5. Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., e Collins, V. P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of

- sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails, Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 4309-13, 1992.
6. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., e Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas, Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 2965-9, 1992.
 7. Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., e Shibuya, M. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors, Jpn J Cancer Res. 81: 773-9, 1990.
 8. Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., e Shibuya, M. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors, Mol Cell Biol. 8: 1816-20, 1988.
 9. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., e Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas, Proc Natl Acad Sci U S A. 87: 8602-6, 1990.
 10. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., e Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity, Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 7727-31, 1994.
 11. Batra, S. K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C. J., Zhu, X., Humphrey, P. A., Friedman, H. S., e Bigner, D. D. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRVIII gene, Cell Growth Differ. 6: 1251-9, 1995.
 12. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., e Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human

- glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis, *Cancer Res.* 56: 5079-86, 1996.
13. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., e Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target, *J Neurovirol.* 4: 148-58, 1998.
 14. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., e Bigner, D. D. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 4207-11, 1990.
 15. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., e Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor, *Br J Cancer.* 73: 1366-72, 1996.
 16. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., e Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody, *Int J Cancer.* 63: 537-43, 1995.
 17. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., e Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors, *Cancer Res.* 55: 5536-9, 1995.
 18. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., e Mendelsohn, J. Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin, *J Clin Oncol.* 18: 904, 2000.
 19. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., e Delattre, J. Y. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas, *Neurosurgery.* 39: 478-83, 1996.

20. Ponten, J. e Macintyre, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta Pathol Microbiol Scand.* 74: 465-86, 1968.
21. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., e Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti- epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies, *Cancer Res.* 44: 1002-7, 1984.
22. Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., e Nice, E. C. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor., *Growth Factors.* 18: 11-29, 2000.
23. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., e Bunn, P. A., Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess, *J Immunol Methods.* 72: 77-89, 1984.
24. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., e Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling, *J Biol Chem.* 272: 2927-35, 1997.
25. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., e Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti- epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N- succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res.* 57: 1510-5, 1997.
26. Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., e Gill, G. N. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice, *Cancer Res.* 46: 4701-5, 1986.

27. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., e Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials, *Ann Oncol.* 8: 1197-206, 1997.
28. den Eynde, B. e Scott, A. M. Tumor Antigens. em: P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition edition, pp. 2424-31. London: Academic Press, 1998.
29. Seymour, L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges, *Cancer Treat Rev.* 25: 301-12, 1999.
30. Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., e Schantz, S. P. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer, *Otolaryngol Head Neck Surg.* 111: 633-43, 1994.
31. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., e Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model, *Clin Cancer Res.* 1: 1311-8, 1995.
32. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., e Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts, *Cancer Res.* 55: 4375-82, 1995.
33. Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., e Zalutsky, M. R. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N- succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res.* 56: 4970-7, 1996.
34. Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., e Geissler, F. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores, *Cancer Res.* 50: 1243-50, 1990.
35. Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., e Zalutsky, M. R. In vitro and in vivo behavior of

- radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent, *Nucl Med Biol.* 24: 639-47, 1997.
36. Mineo, C., Gill, G. N., e Anderson, R. G. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae, *J Biol Chem.* 274: 30636-43, 1999.
37. Gunther, N., Betzel, C., e Weber, W. The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor-ligand complex, *J Biol Chem.* 265: 22082-5, 1990.

EXEMPLO 18

NOVO ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO PARA O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) DE2-7 QUE TAMBÉM RECONHECE O EGFR EXPRESSO EM CÉLULAS CONTENDO AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE EGFR

As seguintes experiências foram apresentadas em Johns *et al.*, *Int. J. Cancer* 98, 2002 e no pedido co-pendente com o N.º de Série 60/342,258 apresentado a 21 de Dezembro de 2001.

O anticorpo monoclonal mAb 806 foi estudado e foram desenvolvidos dados adicionais respeitantes às suas características de ligação ao receptor de EGF, que adicionalmente são corroborativos dos dados aqui apresentados inicialmente. Assim, o seguinte representa uma revisão e uma apresentação do material exposto no pedido de patente e publicação correspondente.

O anticorpo monoclonal (MAb 806) supera potencialmente as dificuldades associadas ao direcionamento do EGFR expresso para a superfície de células tumorais. O mAb 806 ligou-se a células de glioma U87MG transfectadas com EGFR de2-7 (U87MG. 2-7) com elevada afinidade ($\sim 1 \times 10 M^{-1}$), mas não se ligou às células parentais que expressam o EGFR de tipo selvagem. Consistente com esta observação, o mAb 806 foi incapaz de se ligar a uma versão solúvel do EGFR de tipo selvagem contendo o domínio extracelular. Em contraste, a imobilização deste domínio extracelular em placas de ELISA induziu a saturação e ligação de resposta à dose do mAb 806, sugerindo que o mAb 806 se pode ligar ao EGFR de tipo selvagem

sob certas condições. O mAb 806 também se ligou à superfície de células A431, que devido a uma amplificação do gene de EGFR expressam grandes quantidades do EGFR. Interessantemente, o mAb 806 apenas reconheceu 10% das moléculas EGFR totais expressas pelas células A431 e a afinidade de ligação foi inferior à determinada para o EGFR de2-7. O mAb 806 alvejou especificamente xenoenxertos U87MG. 2-7 e A431 criados em ratinhos nus com níveis de pico em xenoenxertos U87MG. -2 detetados 8 h após a injeção. Não foi observado direcionamento específico para xenoenxertos U87MG parentais. Após ligação a células U87MG. 2-7, o mAb 806 foi rapidamente internalizado através de macropinocitose e subsequentemente transportado para lisossomas, um processo que provavelmente contribui para o pico de direcionamento inicial observado nos xenoenxertos. Assim, o mAb 806 pode ser utilizado para alvejar células tumorais contendo amplificação do gene de EGFR ou EGFR de2-7 mas não se liga ao EGFR de tipo selvagem quando expresso à superfície celular.

Tal como discutido acima, o mAb 806 é específico para o EGFR de2-7, contudo liga-se a um epítopo distinto do péptido de junção único. Interessantemente, enquanto o mAb 806 não reconheceu o EGFR de tipo selvagem expresso à superfície de células de glioma, também não se ligou ao domínio extracelular do EGFR de tipo selvagem imobilizado na superfície de placas de ELISA. Para além disso, o mAb 806 ligou-se à superfície de células A431, que têm uma amplificação do gene de EGFR mas não expressam o EGFR de2-7. Por essa razão, é possível que o mAb 806 possa ser utilizado para alvejar especificamente tumores com EGFR amplificado independentemente do seu *status* de EGFR de2-7, embora os nossos resultados sugiram que os tumores co-expressando o recetor mutado mostrariam ainda direcionamento preferencial. Uma vez que o mAb 806 não se liga ao recetor de tipo selvagem na ausência de amplificação do gene, não haveria tomada em tecido normal, um potencial problema associado a anticorpos de EGFR atualmente em desenvolvimento.^{18,19}

MATERIAL e MÉTODOS

MAb e linhas celulares

A linha celular de astrocitoma U87MG foi anteriormente descrita em detalhe.²⁰ Esta linha celular foi infetada com um retrovírus contendo o EGFR de2-7 para produzir a linha celular U87MG. 2-7. As células de carcinoma escamoso humano A431 foram obtidas em ATCC (Rockville, MD). Estas linhas celulares foram cultivadas em DMEM/F-12 com GlutaMAX™ (Life Technologies, Melbourne, Austrália) suplementado com FCS a 10% (CSL, Melbourne, Austrália). A linha de células pro-B de murídeo BaF/3, que não expressa quaisquer moléculas conhecidas relacionadas com EGFR, foi transfetada com EGFR de2-7 tal como descrito acima. O anticorpo DH8.3 (IgG1) foi descrito anteriormente e foi obtido após imunização de ratinhos com o péptido de junção único encontrado em EGFR de2-7.¹⁶ O mAb 806 (IgG2b) foi produzido após imunização de ratinhos com fibroblastos de rato NR6 transfectados com o EGFR de2-7. Foi selecionado para melhor caracterização uma vez que os ensaios de hemaglutinação mostraram um elevado título contra células NR6. EGFR mas fundos baixos em células NR6.wtEGFR. O anticorpo 528, que reconhece tanto de2-7 como EGFR de tipo selvagem, foi descrito anteriormente²¹ e foi produzido na *Biological Production Facility* (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) utilizando um hibridoma obtido em ATCC. O anticorpo policlonal sc-03 dirigido ao domínio COOH-terminal do EGFR foi adquirido em Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Outros reagentes

O domínio extracelular recombinante (aminoácidos 1-621) do EGFR de tipo selvagem (sEGFR) foi produzido tal como anteriormente descrito.²² O péptido de junção único biotinilado (Biotina-LEEKKGNYVVTDH) de EGFR de2-7 foi sintetizado através de química Fmoc padrão e a pureza (>96%) foi determinada através de HPLC de fase inversa e análise espectral de massa (Auspep, Melbourne, Austrália).

Análise FACS

As células foram marcadas com o anticorpo relevante (10 µg/ml) seguido de anti-IgG de rato de cabra conjugado

com fluoresceína (diluição 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Os dados de FACS foram obtidos num Coulter Epics Elite ESP através da observação de um mínimo de 5000 eventos e analisados utilizando EXPO (versão 2) para Windows.

Ensaios ELISA

Foram utilizados dois tipos de ELISA para determinar a especificidade dos anticorpos. No primeiro ensaio, as placas foram revestidas com Segfr (10 µg/ml em tampão carbonato 0,1 M pH 9,2) durante 2 h e depois bloqueadas com albumina de soro humano a 2% (HSA) em PBS. Os anticorpos foram adicionados a poços em triplicado a concentrações crescentes em HSA a 2% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O anticorpo ligado foi detetado através de anti-IgG de ratinho de ovelha conjugado com peroxidase de rábano (Silenus, Melbourne, Austrália) utilizando ABTS (Sigma, Sydney, Austrália) como substrato e a absorbância medida a 405 nm. No segundo ensaio, o péptido específico de de2-7 biotinilado foi ligado a placas de ELISA pré-revestidas com estreptavidina (Pierce, Rockford, Illinois). Os anticorpos foram ligados e detetados como no primeiro ensaio.

Análise Scatchard

Os anticorpos foram marcados com ^{125}I (Amrad, Melbourne, Austrália) através do método de cloramina T e a imunorreatividade foi determinada através de ensaio de Lindmo.²³ Todos os ensaios de ligação foram efetuados em HSA a 1%/PBS em $1-2 \times 10^6$ células U87MG. -2 ou A431 vivas durante 90 min a 4°C com rotação suave. Uma concentração estabelecida de 10 ng/ml de anticorpo marcado com ^{125}I foi utilizada na presença de concentrações crescentes do anticorpo não marcado apropriado. A ligação não específica foi determinada na presença de um excesso de 10000 vezes de anticorpo não marcado. Nem o mAb 806 nem o anticorpo DH8.3 radiomarcados com ^{125}I se ligaram a células U87MG parentais. Após a incubação estar completa, as células foram lavadas e contadas quanto ao anticorpo marcado com ^{125}I ligado utilizando um contador gama COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, CT). A análise Scatchard foi feita após correção para a imunorreatividade.

Ensaio de Internalização

Células U87MG. -2 foram incubadas com o mAb 806 ou o anticorpo DH8.3 (10 µg/ml) durante 1 h em DMEM a 4°C. Após lavagem, as células foram transferidas para DMEM pré-aquecido até 37°C e foram tomadas alíquotas a vários momentos após incubação a 37°C. A internalização foi parada através de lavagem imediata das alíquotas em tampão de lavagem gelado (HSA a 1%/PBS). No termo do decurso de tempo as células foram coradas através de FACS tal como descrito acima. A percentagem de internalização foi calculada através de comparação da coloração do anticorpo da superfície em vários momentos até ao tempo zero utilizando a fórmula: percentagem de anticorpo internalizado = (fluorescência média no momento_x - fluorescência de fundo)/(fluorescência média no momento 0 - fluorescência de fundo)×100. Este método foi validado num ensaio utilizando um anticorpo iodado (MAb 806) para medir a internalização tal como anteriormente descrito.²⁴ As diferenças na taxa de internalização a diferentes momentos foram comparadas utilizando teste t de Student.

Microscopia eletrónica de células U87MG. 2-7

Células U87MG. -2 foram criadas em lâminas de câmaras revestidas com gelatina (Nunc, Naperville, IL) até 80% de confluência e depois lavadas com DMEM gelado. As células foram então incubadas com mAb 806 ou o anticorpo DH8.3 em DMEM durante 45 min a 4°C. Após lavagem, as células foram incubadas durante mais 30 min com anti-IgG de ratinho conjugado com ouro (partículas de 20 nm) (BBInternational, Cardiff, UK) a 4°C. Após outra lavagem, foi adicionado às células DMEM/FCS a 10% pré-aquecido, que foram incubadas a 37°C durante vários tempos de 1-60 min. A internalização do anticorpo foi parada através de meio gelado e as células fixadas com glutaraldeído a 2,5% em PBS/HSA a 0,1% e depois pós-fixadas em tetraóxido de ósmio a 2,5%. Após desidratação através de uma série graduada de acetona, as amostras foram impregnadas em resina Epon/Araldite, cortadas como secções ultrafinas com um micrótomo Reichert Ultracut-S (Leica) e colhidas em redes de níquel. As secções foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo antes de serem observadas num microscópio eletrónico de transmissão Philips CM12 a 80 kV. A análise

estatística dos grãos de ouro dentro das depressões revestidas foi efetuada utilizando um teste de χ^2 .

Estudos de imunoprecipitação

As células foram marcadas durante 16 h com 100 μ Ci/ml de Tran³⁵S-Label (ICN Biomedicals, CA) em DMEM sem metionina/cisteína suplementado com FCS dialisado a 5%. Após lavagem com PBS, as células foram colocadas em tampão de lise (Triton X-100 a 1%, HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, AEBSF 500 μ M, aprotinina 150 nM, inibidor de proteases E-64 1 μ M, EDTA 0,5 mM e leupeptina 1 μ M, pH 7,4) durante 1 h a 4°C. Os lisados foram clarificados através de centrifugação durante 10 min a 12 000g, depois incubados com 5 μ g de anticorpo apropriado durante 30 min a 4°C antes da adição de Proteína A-Sepharose. Os imunoprecipitados foram lavados 3 vezes com tampão de lise, misturados com tampão de amostra SDS, separados através de eletroforese em gel utilizando um gel de Tris/glicina a 4-20% que foi então seco e exposto a película de raios X.

Biodistribuição em ratinhos nus possuindo tumores

Os xenoenxertos tumorais foram estabelecidos em ratinhos nus BALB/c através de injeção s.c. de 3×10^6 células U87MG, U87MG. 2-7 ou A431. A expressão de EGFR de2-7 em xenoenxertos U87MG. 2-7 permanece estável ao longo do período de biodistribuição medido através de imuno-histoquímica a vários momentos (dados não mostrados). As células A431 também mantiveram a sua reatividade com mAb 806 quando criadas como xenoenxertos tumorais tal como determinado através de imuno-histoquímica. As células U87MG ou A431 foram injetadas num lado 7-10 dias antes das células U87MG. -2 serem injetadas no outro lado devido à velocidade de crescimento mais rápida observada para os xenoenxertos possuindo EGFR de2-7. Os anticorpos foram radiomarcados e avaliados quanto à imunoreatividade tal como descrito acima e foram injetados em ratinhos através da via retro-orbital quando os tumores tinham 100-200 mg de peso. Cada ratinho recebeu 2 anticorpos diferentes (2 μ g por anticorpo): 2 μ Ci de mAb 806 marcado com ¹²⁵I e 2 μ Ci de DH8.3 ou 528 marcado com ¹³¹I. A menos que indicado, grupos de 5 ratinhos foram sacrificados a vários momentos pós-injeção e o sangue obtido através de punção

cardíaca. Os tumores, fígado, baço, rins e pulmões foram obtidos através de dissecação. Todos os tecidos foram pesados e avaliados quanto à atividade de ^{125}I e ^{131}I utilizando uma janela de contagem de dois canais. Os dados foram expressos para cada anticorpo como a percentagem de dose injetada por grama de tumor (% ID/g de tumor) determinada através de comparação com padrões de dose injetados ou convertidos em razões de tumor para sangue/fígado (i.e. % ID/g de tumor \div % ID/g de sangue ou fígado). As diferenças entre grupos foram analisadas através do teste t de Student. Após injeção de mAb 806 radiomarcado, alguns tumores foram fixados em formalina, impregnados em parafina, cortados em secções de 5 μm e depois expostos a película de raios X (AGFA, Mortsel, Bélgica) para determinar a localização do anticorpo através de autorradiografia.

RESULTADOS

Ligação dos anticorpos às linhas celulares

Para confirmar a especificidade do mAb 806 e do anticorpo DH8.3, a ligação a células U87MG e U87MG. 2-7 foi analisada através de FACS. Um IgG2b de murídeo irrelevante foi incluído como um controlo do isotipo para mAb 806 e o anticorpo 528 foi incluído uma vez que reconhece tanto o EGFR de2-7 como o de tipo selvagem. Apenas o anticorpo 528 foi capaz de corar a linha celular U87MG (**Figura 1**) consistente com relatórios anteriores que demonstram que estas células expressam o EGFR de tipo selvagem.¹⁰ Tanto o mAb 806 como o anticorpo DH8.3 tiveram níveis de ligação semelhantes ao anticorpo irrelevante, demonstrando claramente que são incapazes de se ligar ao recetor de tipo selvagem (**Figura 1**). A ligação do anticorpo de controlo do isotipo a células U87MG.A2-7 foi semelhante à observada para as células U87MG. O mAb 806 e o anticorpo DH8.3 imunocoraram células U87MG. 2-7, indicando que estes anticorpos reconhecem especificamente o EGFR de2-7 (**Figura 1**). O anticorpo 528 corou U87MG. 2-7 com uma maior intensidade que a célula parental uma vez que se liga tanto ao recetor de2-7 como ao de tipo selvagem que são co-expressos nestas células (**Figura 1**). Importantemente, o mAb 806 também se ligou à linha celular BaF/3. -2, demonstrando que a co-expressão do EGFR de tipo selvagem não é um requisito para a

reatividade do mAb 806 (**Figura 1** mas dados não mostrados aqui).

Ligaçāo dos anticorpos em ensaios ELISA

Para melhor caracterizar a especificidade do mAb 806 e do anticorpo DH8.3, a sua ligação foi examinada através de ELISA. Tanto o mAb 806 como o anticorpo 528 apresentaram curvas de ligação dependentes da dose e de saturação ao sEGFR imobilizado de tipo selvagem (**Figura 2A**). Uma vez que o péptido de junção único encontrado no EGFR de2-7 não está contido dentro do sEGFR, o mAb 806 tem de se ligar a um epítopo situado dentro da sequência do EGFR de tipo selvagem. A ligação do anticorpo 528 foi provavelmente inferior à observada para o mAb 806 uma vez que reconhece um determinante conformacional. Tal como esperado o anticorpo DH8.3 não se ligou ao sEGFR de tipo selvagem mesmo em concentrações até 10 µg/ml (**Figura 2A**). Embora o sEGFR em solução tenha inibido a ligação do anticorpo 528 ao sEGFR imobilizado de um modo dependente da dose, este foi incapaz de inibir a ligação de mAb 806 (**Figura 2B**). Isto sugere que o mAb 806 apenas se pode ligar a EGFR de tipo selvagem uma vez imobilizado em placas ELISA, um processo que pode induzir alterações conformacionais. Foram observados resultados semelhantes utilizando um BIACore por meio do qual o mAb 806 se ligou a sEGFR imobilizado mas o mAb 806 imobilizado não foi capaz de se ligar a sEGFR em solução (dados não mostrados). Após desnaturação através de aquecimento durante 10 min a 95°C, o sEGFR em solução foi capaz de inibir a ligação de mAb 806 a sEGFR imobilizado (**Figura 2C** mas os dados não são aqui mostrados), confirmando que o mAb 806 se pode ligar ao EGFR de tipo selvagem sob certas condições. Interessantemente, o sEGFR desnaturado foi incapaz de inibir a ligação do anticorpo 528 (**Figura 2C** mas os dados não são aqui mostrados), demonstrando que este anticorpo reconhece um epítopo conformacional. O anticorpo DH8.3 exibiu ligação dependente da dose e saturável ao péptido único de EGFR de2-7 (**Figura 2D**). Nem o mAb 806 nem o anticorpo 528 se ligaram ao péptido, mesmo a concentrações superiores às utilizadas para obter ligação de saturação de DH8.3, indicando ainda que o mAb 806 não reconhece um determinante do epítopo dentro deste péptido.

Análise Scatchard dos anticorpos

Foi efetuada uma análise Scatchard utilizando células U87MG. 2-7 para determinar a afinidade relativa de cada anticorpo. Tanto o mAb 806 como o anticorpo DH8.3 mantiveram uma elevada imunorreatividade quando iodados que foi tipicamente superior a 90% para o mAb 806 e 45-50% para o anticorpo DH8.3. O mAb 806 teve uma afinidade para o receptor EGFR de 2-7 de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ enquanto a afinidade de DH8.3 foi umas 10 vezes inferior a $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Nenhum dos anticorpos iodados se ligou às células U87MG parentais. O mAb 806 reconheceu uma média de $2,4 \times 10^5$ locais de ligação por célula com o anticorpo DH8.3 a ligar-se uma média de $5,2 \times 10^5$ locais. Assim, não só houve uma boa concordância no número de receptores entre os anticorpos como também com um relatório anterior mostrando $2,5 \times 10^5$ receptores de 2-7 por célula medidos através de um anticorpo específico de EGFR de 2-7 diferente na mesma linha celular.²⁵

Internalização dos anticorpos por células U87MG. 2-7

A velocidade de internalização do anticorpo após ligação a uma célula alvo influencia tanto as suas propriedades de direcionamento para o tumor como as opções terapêuticas. Consequentemente, examinámos a internalização do mAb 806 e do anticorpo DH8.3 após ligação a células U87MG. 2-7 através de FACS. Ambos os anticorpos mostraram uma internalização relativamente rápida alcançando níveis estáveis aos 10 min para o mAb 806 e aos 30 min para DH8.3 (**Figura 3**). A internalização de DH8.3 foi significativamente superior tanto em termos de velocidade (80,5% do DH8.3 internalizado aos 10 min em comparação com 36,8% para o mAb 806, $p < 0,01$) como de quantidade total internalizada aos 60 min (93,5% vs. 30,4%, $p < 0,001$). O mAb 806 mostrou níveis ligeiramente inferiores de internalização aos 30 e aos 60 min em comparação com 20 min em todos os 4 ensaios efetuados (**Figura 3**). Este resultado foi também confirmado utilizando um ensaio de internalização baseado no mAb 806 iodado (dados não mostrados).

Análise de microscopia eletrónica da internalização dos anticorpos

Dada esta diferença nas velocidades de internalização entre os anticorpos, foi efetuada uma análise detalhada do

tráfico intracelular de anticorpos utilizando microscopia eletrónica. Embora o anticorpo DH8.3 fosse internalizado predominantemente através de depressões revestidas (**Figura 19A**), o mAb 806 pareceu ser internalizado através de macropinocitose (**Figura 19B**). De facto, uma análise detalhada de 32 depressões revestidas formadas em células incubadas com mAb 806 revelou que nenhuma delas continha o anticorpo. Em contraste, cerca de 20% de todas as depressões revestidas das células incubadas com DH8.3 eram positivas para o anticorpo, com várias contendo múltiplos grãos de ouro. Uma análise estatística do número total de grãos de ouro contidos dentro das depressões revestidas verificou que a diferença era altamente significativa ($p < 0,01$). Após 20-30 min ambos os anticorpos podiam ser observados em estruturas que morfologicamente se assemelham a lisossomas (**Figura 19C**). A presença de restos celulares dentro destas estruturas é também consistente com a sua natureza de lisossoma.

Biodistribuição dos anticorpos em ratinhos nus possuindo tumores

A biodistribuição do mAb 806 e do anticorpo DH8.3 foi comparada em ratinhos nus contendo xenoenxertos U87MG num lado e xenoenxertos U87MG. 2-7 no outro. Foi escolhido um período de tempo relativamente curto para este estudo uma vez que um relatório anterior demonstrou que o anticorpo DH8.3 mostra níveis de pico de direcionamento do tumor entre 4-24 h.¹⁶ Em termos de % ID/g de tumor, o mAb 806 alcançou o seu nível de pico em xenoenxertos U87MG. 2-7 de 18,6% ID/g de tumor às 8 h (**Figura 4A**), consideravelmente mais elevado que qualquer outro tecido excepto sangue. Embora DH8.3 também tenha mostrado níveis de pico no tumor às 8 h, o nível foi estatisticamente ($p < 0,001$) inferior a 8,8% ID/g de tumor em comparação com mAb 806 (**Figura 4B**). Os níveis de ambos os anticorpos decaíram lentamente às 24 e 48 h. A autoradiografia de secções de tecido do xenoenxerto U87MG. 2-7 colhidas 8 h após a injeção com o mAb 806 marcado com ¹²⁵I sozinho, ilustra claramente a localização do anticorpo no tumor viável (**Figura 20**). Nenhum dos anticorpos apresentou direcionamento específico para xenoenxertos U87MG parentais (**Figura 4A, 4B**). Em relação às razões de tumor para sangue/fígado, o mAb 806 mostrou a razão mais elevada às 24 h tanto para o sangue (razão de 1,3) como para o fígado (razão de 6,1) (**Figura 5A, 5B**). O anticorpo

DH8.3 teve a sua razão mais elevada no sangue às 8 h (razão de 0,38) e às 24 h em fígado (razão de 1,5) (**Figura 5A, 5B**), as quais são ambas consideravelmente inferiores aos valores obtidos para o mAb 806.

Ligaçāo de mAb 806 a células contendo EGFR amplificado

Para examinar se o mAb 806 podia reconhecer o EGFR expresso em células contendo um gene do recetor amplificado, foi analisada a sua ligação a células A431. Baixa, mas altamente reprodutível, a ligação do mAb 806 a células A431 foi observada através de análise FACS (**Figura 6**). O anticorpo DH8.3 não se ligou às células A431, indicando que a ligação de mAb 806 não era o resultado de baixo nível de expressão de EGFR de2-7 (**Figura 6**). Tal como esperado, o anticorpo anti-EGFR 528 mostrou forte coloração de células A431 (**Figura 6**). A média de 3 dessas experiências deu um valor para a afinidade de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ com $2,4 \times 10^5$ recetores por célula. Assim a afinidade para este recetor foi umas 10 vezes inferior à afinidade para o EGFR de2-7. Para além disso, o mAb 806 parece reconhecer apenas uma pequena porção do EGFR encontrado na superfície de células A431. Utilizando o anticorpo 528 foram medidos aproximadamente 2×10^6 recetores por célula, o que está de acordo com numerosos outros estudos.²⁶ Para assegurar que estes resultados não estavam restringidos simplesmente à linha celular A431, a reatividade do mAb 806 foi examinada em 2 outras linhas celulares exibindo amplificação do gene de EGFR. Foi relatado que tanto a linha celular da cabeça e pescoço HN5²⁷ como a linha celular de cancro da mama²⁸ MDA-468 contém múltiplas cópias do gene de EGFR. Consistente com estes relatórios, o anticorpo 528 mostrou coloração intensa de ambas as linhas celulares (**Figura 21**). Tal como com a linha celular A431, o mAb 806 corou claramente ambas as linhas celulares mas a um nível inferior ao observado com o anticorpo 528 (**Figura 21**). Assim, a ligação do mAb 806 não está simplesmente restringida a células A431 mas parece ser uma observação geral para células contendo amplificação do gene de EGFR.

Imunoprecipitações

A reatividade do mAb 806 foi ainda caracterizada através de imunoprecipitação utilizando células marcadas com ^{35}S . O anticorpo sc-03 (um anticorpo policlonal comercial específico

para o domínio C-terminal do EGFR) imunoprecipitou 3 bandas das células U87MG. ⁻²; um duplo correspondendo às 2 bandas de EGFR de2-7 observadas nestas células e uma banda de peso molecular mais elevado correspondendo ao EGFR wt (**Figura 22**). Em contraste, ao mesmo tempo o mAb 806 imunoprecipitou as 2 bandas de EGFR de2-7, o EGFR wt esteve completamente ausente. O anticorpo sc-03 imunoprecipitou uma única banda correspondendo ao EGFR wt das células A431 (**Figura 22**). O mAb 806 também imunoprecipitou uma única banda correspondendo ao EGFR wt das células A431 (**Figura 22**) mas, consistente com os dados de FACS e Scatchard, a quantidade de EGFR imunoprecipitada pelo mAb 806 foi substancialmente inferior à do EGFR total presente na superfície celular. Dado que o mAb 806 e o sc-03 imunoprecipitaram quantidades semelhantes de EGFR de2-7, este resultado apoia a noção de que o anticorpo mAb 806 apenas reconhece uma porção do EGFR em células que sobre-expressam o receptor. Um IgG2b irrelevante (um controlo do isotipo para mAb 806) não imunoprecipitou EGFR a partir de nenhuma das linhas celulares (**Figura 22**). Utilizando condições idênticas, o mAb 806 não imunoprecipitou o EGFR das células U87MG parentais (dados não mostrados).

Direcionamento in vivo para células A431 pelo mAb 806

Foi efetuado um segundo estudo de biodistribuição com mAb 806 para determinar se podia alvejar xenoenxertos tumorais A431. O estudo foi conduzido ao longo de um período de tempo mais longo para obter mais informação em relação ao direcionamento para xenoenxertos U87MG. ²⁻⁷ pelo mAb 806, que foi incluídos em todos os ratinhos como controlo positivo. Adicionalmente, o anticorpo anti-EGFR 528 foi incluído como controlo positivo para os xenoenxertos A431, uma vez que um estudo anterior demonstrou direcionamento baixo mas significativo deste anticorpo para células A431 criadas em ratinhos nus.²¹ Durante as primeiras 48 h, o mAb 806 mostrou propriedades de direcionamento quase idênticas às observadas nas experiências iniciais (**Figura 7A** em comparação com a **Figura 4A**). Em termos de % ID/g de tumor, os níveis de mAb 806 em xenoenxertos U87MG. ²⁻⁷ decaíram lentamente após 24 h mas permaneceram sempre mais elevados que os níveis detetados em tecido normal. A tomada nos xenoenxertos A431 foi comparativamente baixa, no entanto houve um pequeno aumento na % ID/g de tumor durante as primeiras 24 h não observado em

tecidos normais tais como fígado, baço, rim e pulmão (**Figura 7A**). A tomada do anticorpo 528 foi baixa em ambos os xenoenxertos quando expressa como % ID/g de tumor (**Figura 7B**). A autorradiografia de secções de tecido do xenoenxerto A431 colhidas 24 h após a injeção com mAb 806 marcado com ^{125}I sozinho, ilustra claramente a localização do anticorpo em tumores viáveis em torno da periferia do tumor e não em áreas centrais de necrose (**Figura 23**). Em termos de razão de tumor para sangue o mAb 806 atingiu um pico às 72 h para os xenoenxertos U87MG. 2-7 e às 100 h para os xenoenxertos A431 (**Figura 8A, 8B**). Embora a razão tumor:sangue para o mAb 806 nunca tenha ultrapassado 1,0 em relação ao tumor A431, aumentou ao longo de todo o curso de tempo (**Figura 8B**) e foi mais elevada em todos os outros tecidos examinados (dados não mostrados) indicando baixos níveis de direcionamento. A razão de tumor para sangue para o anticorpo 528 mostrou um perfil semelhante ao mAb 806 embora fossem observados níveis mais elevados nos xenoenxertos A431 (**Figura 8A, 8B**). O mAb 806 teve um pico na razão de tumor para fígado nos xenoenxertos U87MG. 2-7 de 7,6 às 72 h, demonstrando claramente a tomada preferencial nestes tumores em comparação com tecido normal (**Figura 8C**). Outras razões de tumor para órgão para o mAb 806 foram semelhantes às observadas no fígado (dados não mostrados). O pico da razão de tumor para fígado para o mAb 806 em xenoenxertos A431 foi de 2,0 às 100 h, indicando novamente uma tomada ligeiramente preferencial no tumor em comparação com tecido normal (**Figura 8D**).

DISCUSSÃO

O anticorpo monoclonal L8A4 descrito anteriormente dirigido ao péptido de junção único encontrado no EGFR de2-7, comporta-se de um modo semelhante ao mAb 806.³⁸ Utilizando células U87MG transfectadas com o EGFR de2-7, este anticorpo teve uma taxa de internalização semelhante (35% a 1 h em comparação com 30% a 1 h para mAb 806) e apresentou um direcionamento *in vivo* comparável quando se utilizaram fibroblastos 3T3 transfectados com EGFR de2-7 (pico de 24% ID/g de tumor às 24 h em comparação com 18% ID/g de tumor às 8 h para mAb 806).²⁵

Talvez a vantagem mais importante do mAb 806 em comparação com os atuais anticorpos de EGFR, é que o mAb 806

pode ser diretamente conjugado com agentes citotóxicos. Esta abordagem não é praticável com os atuais anticorpos específicos de EGFR uma vez que alvejam o fígado e a conjugação citotóxica induziria quase certamente toxicidade grave. A conjugação de agentes citotóxicos tais como fármacos⁴¹ ou radioisótopos⁴² com anticorpos tem o potencial para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade sistémica destes agentes. A capacidade de um anticorpo conjugado para mediar a morte de tumores está dependente do seu potencial para ser internalizado. Assim, a rápida internalização observada com mAb 806 nas células U87MG. 2-7, sugere que o mAb 806 é um candidato ideal para este tipo de abordagem.

O mAb 806 é novo por ser o primeiro anticorpo específico de EGFR de2-7 dirigido a um epítopo não associado ao péptido de junção único. Tem uma afinidade superior e melhores propriedades de direcionamento para tumores que DH8.3, um anticorpo anteriormente descrito de EGFR de2-7. Uma propriedade importante, no entanto, é a sua capacidade para reconhecer um subconjunto de moléculas EGFR expressas à superfície de células tumorais exibindo amplificação do gene de EGFR. Isto sugere que o mAb 806 pode possuir uma propriedade clínica única; a capacidade para alvejar tanto EGFR de2-7 como EGFR amplificado mas não os receptores de tipo selvagem. Se for provado como correto, este anticorpo não alvejará órgãos tais como o fígado e será por essa razão mais versátil que os atuais anticorpos dirigidos ao EGFR,^{18,19} que não podem ser utilizados para a conjugação de agentes citotóxicos. Finalmente, o mAb 806 pode ser um reagente útil para analisar as alterações conformacionais induzidas pela truncagem encontrada em EGFR de2-7.

REFERÊNCIAS

1. Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, et al. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res* 1997;57:4130 -40.
2. Olapade-Olaopa EO, Moscatello DK, MacKay EH, et al. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;82:186 -94.

3. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995;55:3140 -8.

4. Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundaresan P, et al. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:3217-20.

5. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4309 -13.

6. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2965-9.

7. Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:773-9.

8. Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 1988;8:1816 -20.

9. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, et al. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified re-arranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8602-6.

10. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7727-31.

11. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-9.

12. Nagane M, Coufal F, Lin H, et al. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996;56:5079-86.
13. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 1998;4:148-58.
14. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4207-11.
15. Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1996;73:1366-72.
16. Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1995;63:537-43.
17. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:5536-9.
18. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000;18:904-14.
19. Faillot T, Magdelenat H, Mady E, et al. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* 1996;39:478-83.
20. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968;74:465-86.

21. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, et al. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984;44:1002-7.
22. Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, et al. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 2000;18:11-29.
23. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984;72:77-89.
24. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927-35.
25. Reist CJ, Archer GE, Wikstrand CJ, et al. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1997;57:1510 -5.
26. Santon JB, Cronin MT, MacLeod CL, et al. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. *Cancer Res* 1986;46:4701-5.
27. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991;64:251-4.
28. Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128:898 -905.
29. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations,

function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206.

30. den Eynde B, Scott AM. Tumor antigens. In: Delves PJ, Roitt IM, eds. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic Press, 1998. 2424-31.

31. Seymour L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. *Cancer Treat Rev* 1999;25:301-12.

32. Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, et al. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:633-43.

33. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311-8.

34. Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:5375-83.

35. Reist CJ, Garg PK, Alston KL, et al. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1996;56:4970 -7.

36. Reist CJ, Archer GE, Kurpad SN, et al. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radio iodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res* 1995;55:4375-82.

37. Press OW, DeSantes K, Anderson SK, et al. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res* 1990;50:1243-50.

38. Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII

monoclonal antibody: comparison with its murine parent. *Nucl Med Biol* 1997;24:639 -47.

39. Mineo C, Gill GN, Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 1999;274:30636 -43.

40. Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 2001;61:5355--61.

41. Trail PA, Bianchi AB. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 1999;11:584 -8.

42. DeNardo SJ, Kmger LA, DeNardo GL. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr Opin Immunol* 1999;11:563-9.

EXEMPLO 19

SUPRESSÃO DO CRESCIMENTO DE GLIOBLASTOMAS INTRACRANIANOS XENOENXERTADOS QUE SOBRE-EXPRESSAM RECETORES DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO MUTANTES ATRAVÉS DE ADMINISTRAÇÃO SISTÉMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL (mAb) 806, UM NOVO ANTICORPO MONOCLONAL DIRIGIDO AO RECETOR

Este exemplo apresenta a avaliação do mAb 806 no crescimento de gliomas xenoenxertados intracranianos em ratinhos nus. O seguinte corresponde e foi apresentado em Mishima et al., *Cancer Research* 61: 5349-5354, 2001.

Os dados e descobertas de Mishima et al. estão expostos abaixo.

O tratamento sistémico com mAb 806 reduziu significativamente o volume dos tumores e aumentou a sobrevivência dos ratinhos possuindo xenoenxertos de gliomas U87 MG, LN-Z308, EGFR ou A1207, cada um dos quais expressa elevados níveis de EGFR. Em contraste, o tratamento

com mAb 806 foi ineficaz com ratinhos possuindo os tumores U87 MG parentais, que expressam níveis baixos de EGFR de tipo selvagem endógeno ou os tumores U87 MG.DK, que expressam elevados níveis de EGFR deficiente em quinase. Um ligeiro aumento da sobrevida de ratinhos xenoenxertados com um glioma U87 MG que sobre-expressa EGFR de tipo selvagem (U87 MG.wtEGFR) foi efetuado através de mAb 806 concordante com esta fraca reatividade cruzada com tais células. O tratamento de tumores U87 MG. EGFR em ratinhos com mAb 806 causou diminuições tanto no crescimento como na angiogénesis tumoral, bem como maior apoptose. Em termos de mecanismo, o tratamento *in vivo* com mAb 806 resultou em reduzida fosforilação do EGFR constitutivamente ativo e causou expressão regulada negativamente do protetor apoptótico, Bcl-XL. Estes dados proporcionam evidência pré-clínica de que o tratamento com mAb 806 pode ser um agente bioterapêutico útil para os gliomas agressivos que expressam EGFR.

O presente exemplo demonstra que o tratamento sistémico com o novo mAb específico de EGFR, mAb 806, causa fosforilação reduzida do EGFR constitutivamente ativo e suprime deste modo o crescimento de gliomas implantados intracranianamente que sobre-expressam este recetor mutante em ratinhos nus e prolonga a sua sobrevida. A inibição do crescimento tumoral foi mediada por uma diminuição na proliferação e angiogénesis e aumento da apoptose das células tumorais. Esta supressão afetou a sinalização ativa por EGFR porque os xenoenxertos intracranianos que eram derivados de células que sobre-expressam EGFR deficiente em quinase (DK), que são reconhecidos igualmente bem pelo mAb 806, não foram significativamente suprimidos após a mesma terapia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhas Celulares. Como os explantes primários de glioblastomas humanos perdem rapidamente a expressão de recetores amplificados e rearranjados em cultura, nenhuma linha celular de glioblastoma existente exibe tal expressão. Para forçar a manutenção de níveis de expressão comparáveis com os observados em tumores humanos, U87 MG, LN-Z308 e A1207 (oferta do Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) foram infetadas células com vírus de EGFR, EGFR eficiente em quinase (DK) ou wtEGFR que também conferiram

resistência a G418 tal como descrito anteriormente (21). Populações expressando níveis semelhantes dos vários alelos de EGFR (estes níveis de expressão correspondem aproximadamente a um nível de amplificação de 25 cópias do gene; glioblastomas humanos têm tipicamente níveis de amplificação de 10 a 50 cópias do gene do receptor truncado) foram selecionadas através de FACS tal como descrito anteriormente (21) e designadas como U87 MG. EGFR, U87 MG.DK, U87 MG.wtEGFR, LN-Z308. EGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308.wtEGFR, A1207. EGFR, A1207.DK e A1207.wtEGFR, respectivamente. Cada uma foi mantida em meio contendo G418 (linhas celulares U87 MG, 400 mg/ml; linhas celulares LN-Z308 e A1207, 800 mg/ml). Os mAb mAb 806 (IgG2b, k), um mAb específico de EGFR, foi produzido após imunização de ratinhos com fibroblastos de ratinho NR6 expressando o EGFR. Foi selecionado a partir de vários clones porque os ensaios de hemaglutinação mostraram que tinha uma elevada reatividade contra células NR6. EGFR, baixa reatividade para células NR6.wtEGFR e nenhuma para células NR6.

Imunoprecipitação e Análise Western blot. As células foram lisadas com tampão de lise contendo HEPES 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, glicerol a 10%, Triton X-100 a 1%, EDTA 2 mM, SDS a 0,1%, desoxicólico de sódio a 0,5%, PP_i de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, 5 µg/ml de leupeptina e 5 µg/ml de aprotinina. Os anticorpos foram incubados com lisados celulares a 4°C durante 1 h antes da adição de proteína-A e G-Sepharose. Os imunoprecipitados foram lavados duas vezes com tampão de lise e uma vez com tampão HNTG [HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Triton X-100 a 0,1% e glicerol a 10%], sujeitos a eletroforese e transferidos para membranas de nitrocelulose. Os blots foram sondados com o anticorpo anti-EGFR, C13, e as proteínas foram visualizadas utilizando o sistema de detecção quimioluminescente ECL (Amersham Pharmacia Biotech.). Os mAb utilizados para precipitação foram mAb 806, mAb anti-EGFR clone 528 (Oncogene Research Products, Boston, MA) ou clone EGFR.1 (Oncogene Research Products). Um mAb, C13, utilizado para detecção tanto de EGFR de tipo selvagem como de EGFR nosimunoblots foi proporcionado pelo Dr. G.N. Gill (University of California, San Diego, CA). Os anticorpos para Bcl-X (anticorpo policlonal de coelho; Transduction Laboratories, Lexington, KY) e

fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) foram utilizados para análise *Western blot* tal como descrito anteriormente (26).

Análise de Citometria de Fluxo. As células foram marcadas com o anticorpo relevante seguido de anti-IgG de ratinho de cabra conjugado com fluoresceína (diluição 1:100; Becton-Dickinson PharMingen, San Diego, CA) tal como descrito anteriormente (21). As células coradas foram analisadas com um FACSCalibur utilizando suporte lógico Cell Quest (Becton-Dickinson PharMingen). Para o primeiro anticorpo, foram utilizados os seguintes mAb: mAb 806, mAb anti-EGFR clone 528 e clone EGFR.1. IgG2a ou IgG2b de ratinho foi utilizado como controlo do isotipo.

Terapia Tumoral. Células U87 MG. EGFR $\times 10^5$ ou 5×10^5 de células LN-Z308. EGFR, A1207. EGFR, U87 MG, U87 MG.DK e U87 MG.wtEGFR em 5 μ l de PBS foram implantadas no corpo estriado direito de cérebros de ratinhos nus tal como descrito anteriormente (27). A terapia sistémica com mAb 806 ou o controlo de isotipo IgG2b, foi alcançada através de injeção i.p. de 1 μ g de mAb num volume de 100 μ l dia sim, dia não desde o dia 0 pós-implantação até ao 14. Para terapia direta de tumores U87 MG. EGFR intracerebrais, 10 μ g de mAb 806 ou do controlo do isotipo IgG2b, num volume de 5 μ l foram injetados no local de injeção do tumor dia sim, dia não a começar no dia 1 durante 5 dias.

Imuno-histoquímica. Para avaliar a angiogénesse em tumores, estes foram fixados numa solução contendo cloreto de zinco, impregnados em parafina, seccionados e imunocorados utilizando um anticorpo monoclonal de rato anti-ratinho CD31 (Becton-Dickinson PharMingen; 1:200). A avaliação da proliferação de células tumorais foi efetuada através de imuno-histoquímica de Ki-67 em tecidos tumorais fixados em formalina e impregnados em parafina. Após desparafinação e reidratação, as secções de tecido foram incubadas com peróxido de hidrogénio a 3% em metanol para extinguir a peroxidase endógena. As secções foram bloqueadas durante 30 min com soro de cabra e incubadas de um dia para o outro com anticorpo primário a 4°C. As secções foram então lavadas com PBS e incubadas com um anticorpo secundário biotinilado durante 30

min. Após várias lavagens com PBS, os produtos foram visualizados utilizando estreptavidina-peroxidase de rábano com diaminobenzidina como cromogénio e hematoxilina como contrastante. Como medida de proliferação, o índice de marcação de Ki-67 foi determinado como a razão de núcleos marcados:total em campos de elevada potência (3400). Foram contados aproximadamente 2000 núcleos em cada caso através de amostragem aleatória sistemática. Para coloração de macrófagos e células NK, secções congeladas, fixadas com solução de paraformaldeído a 4% tamponada, foram imunocoradas utilizando mAb F4/80 biotinilado (Serotec, Raleigh, NC) e anticorpo policlonal de coelho anti-asialo GM1 (Dako Chemicals, Richmond, VA), respetivamente. A angiogénesse foi quantificada como área de vasos utilizando análise computorizada. Para este fim, secções foram imunocoradas utilizando anti-CD31 e foram analisadas utilizando um sistema computorizado de análise de imagem sem contrastante. As MVA foram determinadas através de captura de imagens digitais das secções a uma ampliação de 3200 utilizando uma câmara CCD a cores tal como descrito anteriormente (27). As imagens foram então analisadas utilizando suporte lógico Image Pro Plus versão 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) e a MVA foi determinada através da medição da quantidade total de coloração em cada secção. Foram avaliados quatro campos para cada lâmina. Este valor foi representado como a percentagem da área total em cada campo. Os resultados foram confirmados em cada experiência por pelo menos dois observadores (K.M., H-J. S.H.).

Ensaio TUNEL. As células apoptóticas no tecido tumoral foram detetadas através da utilização do método TUNEL tal como descrito anteriormente (27). As células positivas em TUNEL foram contadas a $\times 400$. O índice apoptótico foi calculado como a razão do número de células apoptóticas:número total de células em cada campo.

Análise Estatística. Os dados foram analisados quanto à significância do teste t de Student, exceto para os ensaios de sobrevivência *in vivo*, que foram analisados através de análise de Wilcoxon.

RESULTADOS

O Tratamento Sistémico com mAb 806 Prolonga a Sobrevida de Ratinhos Possuindo Tumores Glioma Intracranianos Que sobre-expressam EGFR

Para testar a eficácia do mAb anti-EGFR, mAb 806, tratámos ratinhos nus possuindo xenoenxertos intracranianos de glioma sobre-expressando EGFR com injeções i.p. de mAb 806, o IgG de controlo do isotipo ou PBS. Células U87 MG. EGFR foram implantadas intracranianamente em ratinhos nus e os tratamentos começaram no mesmo dia tal como descrito em "Materiais e Métodos".

Os animais tratados com PBS ou IgG de controlo do isotipo tiveram uma sobrevida mediana de 13 dias, enquanto os ratinhos tratados com mAb 806 tiveram um aumento de 61,5% na sobrevida mediana até 21 dias ($P < 0,001$; **Figura 24A**). O tratamento de ratinhos 3 dias pós-implantação, após estabelecimento do tumor, também prolongou a sobrevida mediana dos animais tratados com mAb 806 em 46,1% (de 13 dias para 19 dias; $P < 0,01$) em comparação com a dos grupo de controlo (dados não mostrados). Para determinar se estes efeitos antitumorais do mAb 806 se estendiam a xenoenxertos U87 MG. EGFR, fizemos também tratamentos semelhantes a animais possuindo xenoenxertos de outras células de glioma LN-Z308. EGFR e A1207. EGFR. A sobrevida mediana dos ratinhos tratados com mAb 806 possuindo xenoenxertos LN-Z308. EGFR foi prolongada de 19 dias para os controlos para 58 dias ($P < 0,001$; **Figura 24B**). Notavelmente, quarenta e oito animais tratados com mAb 806 sobreviveram para além de 60 dias (**Figura 24B**). A sobrevida mediana dos animais possuindo xenoenxertos A1207. EGFR foi também prolongada de 24 dias para os controlos para 29 dias ($P < 0,01$; dados não mostrados).

O Tratamento com mAb 806 Inibe o Crescimento de Tumores Cerebrais Que sobre-expressam EGFR

Ratinhos possuindo xenoenxertos U87 MG. EGFR e LN-Z308. EGFR foram mortos no dia 9 e dia 15, respetivamente. Secções tumorais foram analisadas histopatologicamente e o volume dos tumores foi determinado tal como descrito em "Materiais e Métodos". Consistente com os resultados

observados para a sobrevivência animal, o tratamento com mAb 806 reduziu significativamente os volumes dos xenoenxertos U87 MG. EGFR em 90% $P < 0,001$; **Figura 24C**) e de xenoenxertos LN-Z308. EGFR em 95% $P < 0,001$; **Figura 24D**) em comparação com os do grupo de controlo. Resultados semelhantes foram obtidos para animais possuindo tumores A1207. EGFR (redução de 65% do volume; $P < 0,01$; dados não mostrados).

O Tratamento Intratumoral com mAb 806 Prolonga a Sobrevida de Ratinhos Possuindo Tumores Cerebrais U87 MG. EGFR

Determinámos também a eficácia da injeção intratumoral direta do mAb 806 para o tratamento de xenoenxertos U87 MG. EGFR. Foram dadas aos animais injeções intratumorais de mAb 806 ou de IgG de controlo do isotipo no 1 dia pós-implantação, tal como descrito em "Materiais e Métodos". Os animais de controlo sobreviveram durante 15 dias, enquanto os ratinhos tratados com mAb 806 permaneceram vivos durante 18 dias ($P < 0,01$; **Figura 24E**). Embora o tratamento intratumoral com mAb 806 fosse de algum modo eficaz, implicou as dificuldades das múltiplas injeções intracranianas e do risco aumentado de infecção. Por essa razão, centrámo-nos nos tratamentos sistémicos para estudos adicionais.

O Tratamento com mAb 806 Prolonga Ligeiramente a Sobrevida de Ratinhos Possuindo Xenoenxertos Intracranianos U87 MG.wtEGFR mas não de Ratinhos Possuindo U87 MG ou U87 MG.DK

Para determinar se a inibição do crescimento por mAb 806 era seletiva para tumores expressando EGFR, tratámos animais possuindo U87 MG, U87 MG.DK (EGFR deficiente em quinase) ou xenoenxertos cerebrais U87 MG.wtEGFR. O tratamento com mAb 806 não prolongou a sobrevida de ratinhos implantados com tumores U87 MG (**Figura 25A**), que expressam um nível baixo de wtEGFR endógeno (22), nem de animais possuindo xenoenxertos U87 MG.DK, que sobre-expressam um EGFR deficiente em quinase para além de um nível baixo de wtEGFR endógeno (**Figura 25B**). O tratamento com mAb 806 prolongou ligeiramente a sobrevida de ratinhos possuindo tumores U87 MG.wtEGFR ($P < 0,05$; sobrevida mediana, 23 dias versus 26 dias para os grupos de controlo), que sobre-expressam wtEGFR (**Figura 25C**).

A Reatividade do mAb 806 Correlaciona-se com a Eficácia Antitumoral in Vivo

Para compreender o efeito diferencial do mAb 806 em tumores expressando vários níveis ou diferentes tipos de EGFR, determinámos a reatividade do mAb 806 com várias células tumorais através de análise FACS. Consistente com relatórios anteriores (21), o mAb 528 anti-EGFR reconheceu tanto EGFR como wtEGFR e demonstrou uma coloração mais forte para células U87 MG. EGFR em comparação com células U87 MG (**Figura 26A**, 528). Em contraste, o anticorpo EGFR.1 reagiu com wtEGFR mas não com EGFR(21), porque as células U87 MG. EGFR foram fracamente reativas como as células U87 MG (**Figura 26A**, painel EGFR.1). Este anticorpo EGFR.1 reagiu com U87 MG.wtEGFR mais intensamente que com as células U87 MG, porque as células U87 MG.wtEGFR sobre-expressam wtEGFR (**Figura 26A**, painel EGFR.1). Embora o mAb 806 tenha reagido intensamente com células U87 MG. EGFR e U87 MG.DK e à com células U87 MG, reagiu fracamente com U87 MG.wtEGFR, o que indicou que o mAb 806 é seletivo para EGFR com uma fraca atividade cruzada para o wtEGFR sobre-expresso (**Figura 26A**, painel mAb 806). Este nível de reatividade com U87 MG.wtEGFR foi quantitativamente e qualitativamente semelhante ao prolongamento da sobrevivência mediado através do tratamento de anticorpo (**Figura 25C**). Determinámos ainda a especificidade do mAb 806 através de imunoprecipitação. Os EGFR em várias linhas celulares foram imunoprecipitados com anticorpo 528, EGFR.1 e mAb 806. Os blots de proteínas separadas eletroforeticamente foram então sondados com o anticorpo anti-EGFR, C13, que reconhece wtEGFR bem como EGFR e DK (22). Consistente com a análise FACS, o anticorpo 528 reconheceu wtEGFR e receptores mutantes (**Figura 26B**, painel IP: 528), enquanto o anticorpo EGFR.1 reagiu com wtEGFR mas não com a espécie mutante (**Figura 26B**, painel IP: EGFR.1). Para além disso, os níveis de receptores mutantes em células U87 MG. EGFR e U87 MG.DK são comparáveis aos de wtEGFR em células U87 MG.wtEGFR (**Figura 26B**, painel IP: 528).

No entanto, o anticorpo mAb 806 foi capaz de precipitar apenas uma pequena quantidade do wtEGFR a partir dos lisados de células U87 MG.wtEGFR em comparação com a quantidade maior de receptor mutante precipitada a partir de células U87 MG. EGFR e U87 MG.DK e uma quantidade indetectável a partir das

células U87 MG (**Figura 26B**, painel IP: mAb 806). Coletivamente, estes dados sugerem que o mAb 806 reconhece um epítopo em EGFR que também existe numa pequena fração de wtEGFR apenas quando é sobre-expresso à superfície celular.

O Tratamento com mAb 806 Reduz a Autofosforilação de EGFR e Regula Negativamente a Expressão de Bcl-XL em Tumores Cerebrais U87 MG. EGFR

Os mecanismos subjacentes à inibição do crescimento por mAb 806 foram investigados a seguir. Como a atividade de quinase constitutivamente ativa e a autofosforilação do terminal COOH do EGFR são essenciais para as suas funções biológicas (21, 22, 28, 29), o status de fosforilação foi determinado em tumores de animais tratados e de controlo. Tal como mostrado na **Figura 27A**, o tratamento com mAb 806 reduziu dramaticamente a autofosforilação de EGFR, apesar dos níveis do recetor serem apenas ligeiramente menores nos xenoenxertos tratados com mAb 806. Mostrámos anteriormente que a autofosforilação do recetor causa regulação positiva do gene anti-apoptótico, *Bcl-XL*, que tem um papel chave na redução da apoptose de tumores que sobre-expressam EGFR (28, 29). Por essa razão, foi a seguir determinado o efeito do tratamento com mAb 806 na expressão de *Bcl-XL*. Os tumores de EGFR de animais tratados com mAb 806 mostraram de facto níveis reduzidos de *Bcl-XL* (**Figura 27A**).

O Tratamento com mAb 806 Diminui o Crescimento e a Angiogénese e Aumenta a Apoptose em Tumores U87 MG. EGFR

À luz da supressão *in vivo* causada pelo tratamento com mAb 806 e dos seus efeitos bioquímicos na sinalização do recetor, determinámos a taxa de proliferação de tumores de ratinhos de controlo ou tratados. O índice proliferativo, medido através de coloração de Ki-67 dos tumores tratados com mAb 806, foi significativamente inferior ao dos tumores de controlo ($P < 0,001$; **Figura 28**). Adicionalmente, a análise do índice apoptótico através de coloração TUNEL demonstrou um aumento significativo no número de células apoptóticas em tumores tratados com mAb 806 em comparação com os tumores de controlo ($P < 0,001$; **Figura 28**). A extensão de vascularização do tumor foi também analisada através de imunocoloração de

tumores de espécimes tratados e de controlo para CD31. Para quantificar a vascularização do tumor, as MVA foram medidas utilizando análise de imagem computorizada. Os tumores tratados com mAb 806 mostraram 30% menos MVA que os tumores de controlo ($P < 0,001$; **Figura 28**). Para compreender se a interação entre o recetor e o anticorpo pode desencadear uma resposta inflamatória, corámos secções tumorais para o marcador de macrófagos, F4/80, e o marcador de células NK, asialo GM1. Os macrófagos foram identificados ao longo da matriz tumoral e acumularam-se especialmente em torno da periferia do tumor U87 MG. EGFR tratado com mAb 806 (**Figura 28**). Observámos poucas células NK infiltradas e em torno dos tumores e nenhuma diferença significativa entre os tumores tratados com mAb 806 e com controlo do isotipo (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

EGFR parece ser um potencial alvo terapêutico atrativo para tratamento de cancros glioma. Está correlacionado com fraco prognóstico (25), enquanto a sua inibição genética ou farmacológica suprime eficazmente o crescimento de células que sobre-expressam EGFR tanto *in vitro* como *in vivo* (29,30). Como este EGFR mutante é expresso à superfície celular, representa um potencial alvo para terapia baseada em anticorpos, e, aqui, testámos a eficácia de um novo mAb anti-EGFR, mAb 806, no tratamento de xenoenxertos intracranianos de gliomas que sobre-expressam EGFR de diferentes fundos celulares em ratinhos nus. A administração sistémica de mAb 806 inibiu o crescimento tumoral e prolongou a sobrevivência animal. O efeito de mAb 806 foi evidente para cada linha celular e foi independente do *status* de p53 dos tumores, porque U87 MG. EGFR e A1207. EGFR expressavam p53 de tipo selvagem, enquanto LN-Z308. EGFR foi nula para p53.

A maior tumorigenicidade de EGFR mediada através da sua atividade de quinase constitutivamente ativa e da autofosforilação de tirosina no terminal COOH (22,28,29). A fosforilação de EGFR em tumores tratados com mAb 806 foi significativamente menor, a proliferação foi reduzida e a apoptose foi elevada, o que sugere que o efeito antitumoral do mAb 806 é, pelo menos em parte, atribuível à inibição da função intrínseca do recetor. A sinalização de EGFR causou

regulação positiva do gene anti-apoptótico, *Bcl-X_L* (28) e o tratamento com mAb 806 resultou na regulação negativa da expressão de *Bcl-X_L*, que sugere ainda que o efeito antitumoral do mAb 806 é mediado pela inibição da sinalização de EGFR. O nível de EGFR em tumores tratados com mAb 806 foi também ligeiramente reduzido (**Figura 27A**), mas não até um grau que fosse consistente com o grau de desfosforilação do receptor mutante ou suficiente para explicar a amplitude do seu efeito biológico. O efeito antitumoral de mAb 806 é provável que resulte, pelo menos em parte, da inibição da função de sinalização intrínseca de EGFR. Esta asserção é também apoiada pela falta de efeitos antitumorais em tumores DK, que se ligam ao anticorpo mas são deficientes em quinase.

A injeção intratumoral de um anticorpo anti-EGFR diferente, mAb Y10, inibiu o crescimento de tumores melanoma B16 expressando EGFR em cérebros de ratinho através de um mecanismo dependente do receptor Fc/Fc (31). Em conjunto com isto, mostrou-se que mAb Y10 medeia a citotoxicidade de macrófagos dependente de anticorpos *in vitro* com células efectoras tanto de murídeo como humanas (17), embora tenha tido pouco efeito com a infiltração de macrófagos encontrada nos nossos tumores tratados com mAb 806 o que levanta a questão quanto a se o efeito antitumoral de mAb 806 pode ser alcançado através da citotoxicidade medida por macrófagos. Crê-mos que isto seja improvável, porque a infiltração de macrófagos também ocorreu no tratamento com mAb 806 de tumores U87 MG.DK (EGFR deficiente em quinase), nos quais foi ineficaz na regulação do crescimento tumoral.

O mAb 806 parece ser seletivo para EGFR com uma fraca reatividade cruzada com wtEGFR sobre-expresso. Consistente com a especificidade *in vitro*, o tratamento com mAb 806 foi muito eficaz em tumores que sobre-expressam EGFR, enquanto que mostrou uma inibição do crescimento muito menos robusta, mas reproduzível, para tumores que sobre-expressam wtEGFR. No entanto, a simples interação entre mAb 806 e as suas moléculas alvo é insuficiente para inibir o crescimento tumoral porque, embora o mAb 806 seja capaz de se ligar igualmente bem aos receptores EGFR deficientes em quinase (DK) e EGFR, ineficaz a afetar o crescimento de tumores expressando DK. A incapacidade do mAb 806 para interagir com o baixo nível de

wtEGFR normalmente presente nas células sugere uma grande janela terapêutica para cancros que sobre-expressem EGFR bem como, numa menor extensão, os que sobre-expressem wtEGFR quando comparados com tecidos normais.

Embora o tratamento com mAb 806 tenha sido eficaz para supressão de xenoenxertos intracranianos, deve também notar-se que os tumores de EGFR eventualmente cresceram e não foram alcançadas remissões duráveis. Isto pode ter resultado da distribuição ineficiente do anticorpo na massa tumoral. Mostrou-se que os mAb em combinação com outras modalidades terapêuticas tais como toxinas, isótopos ou fármacos, para tratamentos de cancro eram mais eficazes que o anticorpo sozinho em muitos casos (2,3,32-34). Mostrou-se também que fármacos quimioterapêuticos tais como doxorrubicina e cisplatina em conjunto com anticorpos de wtEGFR aumentaram a atividade antitumoral (35,36). Os tratamentos de combinação apontados ao crescimento tumoral bem como ao desenvolvimento angiogénico inibiram mais eficazmente o crescimento de glioblastomas que cada tratamento sozinho (27). Isto levanta a possibilidade do mAb 806 em combinação com fármacos quimioterapêuticos ou compostos moduladores da angiogéneses poder ser ainda mais eficaz que o mAb 806 sozinho.

REFERÊNCIAS

1. Old, L. J. Immunotherapy for cancer. *Sci. Am.*, 275: 102-109, 1996.
2. Weiner, L. M. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 41-50, 1999.
3. Green, M. C., Murray, J. L., e Hortobagyi, G. N. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat. Rev.*, 26: 269-286, 2000.
4. Ashley, D. M., Batra, S. K., e Bigner, D. D. Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors. *J. Neurooncol.*, 35: 259-273, 1997.

5. Fan, Z., e Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67-73, 1998.

6. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., e Press, M. F. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (Wash. DC)*, 244: 707-712, 1989.

7. Harari, D., e Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/BER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 19: 6102-6114, 2000.

8. Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., e Fox, J. A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 60-70, 1999.

9. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., e Norton, L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14: 737-744, 1996.

10. Baselga, J. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37: 18-24, 2001.

11. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., e Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232, 1995.

12. Mendelsohn, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 3: 2703-2707, 1997.

13. Waksal, H. W. Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 427-436, 1999.

14. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Groppe, P., Poisson, M., e Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery (Baltimore)*, 39: 478-483, 1996.
15. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., e Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.
16. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., e Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2965-2969, 1992.
17. Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., e Bigner, D. D. Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 451-464, 1999.
18. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundaresan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., e Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.
19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., e Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536-5539, 1995.
20. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., e Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186-194, 2000.
21. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., e Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced

tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727-7731, 1994.

22. Huang, H-J. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., e Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927-2935, 1997.

23. Mishima, K. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., e Huang, H-J. S. Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion in vivo. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40: 519, 1999.

24. Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., e Huang, H. J. Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.*, 56: 3859-3861, 1996.

25. Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., e Guha, A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery (Baltimore)*, 45: 1442-1453, 1999.

26. Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., e Huang, H-J. S. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5724-5729, 1998.

27. Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., e Huang, H-J. S. A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis in vivo in combination with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8484-8489, 2000.

28. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., e Huang, H-J. S. A common mutant epidermal growth

factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56: 5079-5086, 1996.

29. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., e Huang, H-J. S. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.*, 162 (Suppl. 1): S17-S21, 2001.

30. Halatsch, M. E., Schnidt, U., Botefur, L C., Holland, J. F., e Ohnuma, T. Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity in vitro by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. *J. Neurosurg.*, 92: 297-305, 2000.

31. Sampson, J. H. Crotty, L. E., Lee, S., Archer, Q. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Rale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., e Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.

32. Trail, P. A, e Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.

33. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D, A., e Slamon, D. J. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*, 17: 2235-2249, 1998.

34. Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., e Mendelsohn, J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 58: 2825-2831, 1998.

35. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., e Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 85: 1327-1333, 1993.

36. Fan, Baselga, J., Masui, HL, e Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.

EXEMPLO 20

ANTICORPO MONOCLONAL 806 INIBE O CRESCIMENTO DE XENOENXERTOS TUMORAIS EXPRESSANDO O RECETOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) DE2-7 OU AMPLIFICADO MAS NÃO O EGFR DE TIPO SELVAGEM

O seguinte exemplo apresenta descobertas pelos presentes inventores que são também expostas em Luwor *et al.*, *Cancer Research* 61: 5355-5361, 2001.

O anticorpo monoclonal (mAb) 806 foi criado contra o recetor do fator de crescimento epidérmico delta2-7 (EGFR de2-7 ou EGFRvIII), uma versão truncada do EGFR vulgarmente expressa em glioma. Inesperadamente, o mAb 806 também se ligou ao EGFR expresso por células exibindo amplificação do gene *EGFR* mas não a células ou tecidos normais expressando o recetor de tipo selvagem na ausência de amplificação do gene. A especificidade única do mAb 806 oferece uma vantagem sobre os atuais anticorpos de EGFR, que apresentam todos ligação significativa ao fígado e à pele em humanos. Por essa razão, examinámos a atividade antitumoral do mAb 806 contra xenoenxertos tumorais humanos criados em ratinhos nus. O crescimento de xenoenxertos U87 MG, uma linha celular de glioma que expressa endogenamente 10EGFR na ausência de amplificação do gene, não foi inibido pelo mAb 806. Em contraste, o mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos U87 MG transfectados com o EGFR de2-7 de um modo dependente da dose utilizando tanto o modelo preventivo como o de tumor estabelecido. Significativamente, células U87 MG transfectadas com o EGFR de tipo selvagem, que aumentou a expressão até 10 EGFR/célula e imita a situação de amplificação do gene, foram também inibidas por mAb 806 quando criadas como xenoenxertos em ratinhos nus. Os xenoenxertos tratados com mAb 806 mostraram todos grandes áreas de necrose que estavam ausentes nos tumores de controlo. Esta redução da viabilidade do xenoenxerto não foi mediada pela regulação

negativa do recetor nem pela seleção clonal porque os níveis de expressão do抗ígeno eram semelhantes nos grupos de controlo e tratados. O efeito antitumoral do mAb 806 não foi restrito a células U87 MG porque o anticorpo inibiu o crescimento de xenoenxertos A431 novos e estabelecidos, uma linha celular expressando $>10^6$ EGFR/célula. Este estudo demonstra que o mAb 806 possui atividade antitumoral significativa.

O mAb 806 específico para EGFR de2-7 foi produzido após imunização de ratinhos com fibroblastos de ratinho NR6 expressando o EGFR de2-7 truncado. O mAb 806 liga-se à linha celular de glioma U87 MG transfectada com o EGFR de2-7 mas não à linha celular U87 MG parental, que expressa o EGFR wt sem amplificação do gene.³ Foram observados resultados semelhantes *in vivo* com o mAb 806 a apresentar direcionamento específico para xenoenxertos U87 MG expressando EGFR de2-7 mas não dos tumores U87 MG parentais.³ Interessantemente, o mAb 806 foi capaz de se ligar a um subconjunto de EGFR (10%) na superfície da linha celular A431, que contém um gene EGFR amplificado. Por essa razão, ao contrário de todos os outros anticorpos específicos de EGFR de2-7, que reconhecem o péptido de junção único que é gerado pela truncagem de EGFR de2-7, o mAb 806 liga-se a um epítopo também encontrado em EGFR wt sobre-expresso. No entanto, parece que este anticorpo é preferencialmente exposto no EGFR de2-7 e uma pequena proporção de recetores expressos em células contendo amplificação do gene EGFR wt. Importantemente, os tecidos normais que expressam níveis elevados de EGFR wt endógeno, tais como fígado e pele, não mostram ligação significativa do mAb 806. Com base na propriedade única do mAb 806 se ligar tanto a de2-7 como ao EGFR wt amplificado mas não ao EGFR wt nativo quando expresso a níveis normais, decidimos examinar a eficácia do mAb 806 contra várias linhas celulares tumorais criadas como xenoenxertos em ratinhos nus.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhos Celulares e Anticorpos Monoclonais. A linha celular de glioblastoma humano U87 MG, que expressa endogenamente o EGFR wt e as linhas celulares transfectadas U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR, que expressam o EGFR de2-7 e sobre-expressam o EGFR wt, respetivamente, foram descritas

anteriormente (16,23). A linha celular de carcinoma epidermoide A431 foi descrita anteriormente (24).

Todas as linhas celulares foram mantidas em DMEM (DMEM/F12; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) contendo FCS a 10% (CSL, Melbourne, Victoria, Austrália), glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e penicilina/estreptomicina (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Adicionalmente, as linhas celulares U87 MG.D2-7 e U87 MG.wtEGFR foram mantidas em 400 mg/ml de geneticina (Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Austrália). As linhas celulares foram criadas a 37°C numa atmosfera húmida de CO₂ a 5%. O mAb 806 (IgG2b) foi produzido após imunização de ratinhos com fibroblastos de ratinho NR6 expressando o EGFR de2-7. O mAb 806 foi selecionado após ensaios de roseta mostrando ligação a células NR6, que sobre-expressam o EGFR de2-7 (título de 1:2500). O mAb 528, que reconhece tanto de2-7 como EGFR wt, foi descrito anteriormente (10) e foi produzido na *Biological Production Facility* (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Victoria, Austrália) utilizando um hibridoma obtido em American Type Culture Collection (Rockville, MD). O mAb DH8.3, que é específico para o EGFR de2-7, foi gentilmente proporcionado pelo Prof. William Gullick (University of Kent and Canterbury, Kent, Reino Unido) (19). O anticorpo policlonal sc-03 dirigido ao domínio COOH-terminal do EGFR foi adquirido em Santa Cruz Bio-technology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Análise FACS da Expressão do Recetor. As linhas celulares U87 MG parentais cultivadas e transfectadas foram analisadas quanto à expressão de EGFR wt e de2-7 utilizando os anticorpos 528, 806 e DH8.3. As células (1 3 10 6) foram incubadas com 5 mg/ml do anticorpo apropriado ou um controlo negativo do mesmo isotipo em PBS contendo HSA a 1% durante 30 min a 4°C. Após três lavagens com PBS/HSA a 1%, as células foram incubadas mais 30 min a 4°C com anticorpo de cabra anti-ratinho conjugado com FITC (diluição 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Após três lavagens subsequentes, as células foram analisadas num Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL) através da observação de um mínimo de 20000 eventos e analisadas utilizando EXPO (versão 2) para Windows.

Análise Scatchard. O mAb 806 foi marcado com ^{125}I (Amrad, Melbourne, Victoria, Austrália) através do método de Cloramina T. Todos os ensaios de ligação foram efetuados em HSA a 1%/PBS em $1-2 \times 10^6$ células U87 MG. -2 ou A431 vivas durante 90 min. a 4°C com rotação suave. Uma concentração estabelecida de 10 ng/ml de mAb 806 marcado com ^{125}I foi utilizada na presença de concentrações crescentes de anticorpo não marcado. A ligação não específica foi determinada na presença de um excesso de 10000 vezes de anticorpo não marcado. Após incubação, as células foram lavadas e contadas quanto ao mAb 806 marcado com ^{125}I ligado utilizando um contador gama COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, CT). A análise Scatchard foi feita após correção para a imunorreatividade.

Estudos de Imunoprecipitação. As células foram marcadas durante 16 h com 100 mCi/ml de Tran 35 S-Label (ICN Biomedicals, Irvine, CA) em DMEM sem metionina/cisteína suplementado com FCS dialisado a 5%. Após lavagem com PBS, as células foram colocadas em tampão de lise (Triton X-100 a 1%, HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, 4-(2-aminoetil)benzenossulfonil-fluoreto 500 mM, aprotinina 150 nM, inibidor de proteases E-64 1 mM, EDTA 0,5 mM e leupeptina 1 mM, pH 7,4) durante 1 h a 4°C. Os lisados foram clarificados por centrifugação durante 10 min a 12 000g e depois incubados com 5 mg de anticorpo apropriado durante 30 min a 4°C antes da adição de Proteína A-Sepharose. Os imunoprecipitados foram lavados 3 vezes com tampão de lise, misturados com tampão de amostra SDS, separados através de eletroforese em gel utilizando um gel a 7,5% que foi então seco e exposto a película de raios X.

Modelos de Xenoenxerto. Consistente com relatórios anteriores (23,25), as células U87 MG transfetadas com EGFR de2-7 cresceram mais rapidamente que as células parentais e as células U87 MG transfetadas com o EGFR wt. Células tumorais (3×10^6) em 100 ml de PBS foram inoculadas s.c. em ambos os flancos de ratinhos nus fêmea com 4-6 semanas de idade (Animal Research Center, Western Austrália, Perth, Austrália). A eficácia terapêutica do mAb 806 foi investigada tanto no modelo preventivo como no de tumores estabelecidos. No modelo preventivo, cinco ratinhos com dois xenoenxertos cada foram tratados i.p. com 0,1 ou 1 mg de mAb 806 ou veículo (PBS) a

começar no dia antes da inoculação das células tumorais. O tratamento foi continuado durante um total de seis doses, três vezes por semana durante 2 semanas. No modelo estabelecido, o tratamento foi iniciado quando os tumores alcançaram um volume médio de 65 mm³ (U87 MG. 2-7), 84 mm³ (U87 MG), 73 mm³ (U87 MG.wtEGFR) ou 201 mm³ (tumores A431). O volume do tumor em mm³ foi determinado utilizando a fórmula (comprimento 3 largura 2)/2, onde o comprimento era o eixo mais longo e a largura a medida perpendicular ao comprimento (26). Os dados foram expressos como volume tumoral médio ± EP para cada grupo de tratamento. Este projeto de investigação foi aprovado pelo *Animal Ethics Committee de Austin and Repatriation Medical Centre*.

Exame Histológico de Xenoenxertos Tumorais. Os xenoenxertos foram excisados nos momentos indicados e divididos ao meio. Uma metade foi fixada em formalina/PBS a 10% antes de ser impregnada em parafina. Secções de 4 mm foram então cortadas e coradas com H&E para exame histológico de rotina. A outra metade foi impregnada em composto Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), congelada em azoto líquido e armazenada a -80°C. Secções finas de crióstato (5 mm) foram cortadas e fixadas em acetona gelada durante 10 min, seguido de secagem ao ar durante mais 10 min. As secções foram bloqueadas em reagente de bloqueio de proteínas (Lipshaw Immunon, Pittsburgh, PA) durante 10 min e depois incubadas com anticorpo primário biotinilado (1 mg/ml) durante 30 min à temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram biotinilados utilizando o módulo de biotinilação de proteínas ECL (Amersham, Baulkham Hills, NSW, Austrália), segundo as instruções do fabricante. Após lavagem com PBS, as secções foram incubadas com um complexo de estreptavidina-peroxidase de rábano durante mais 30 min (Silenus, Melbourne, Victoria, Austrália). Após uma lavagem final com PBS as secções foram expostas ao substrato 3-amino-9-etylcarbazole [ácido acético 0,1 M, acetato de sódio 0,1 M, 3-amino-9-etylcarbozole 0,02 M (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)] na presença de peróxido de hidrogénio durante 30 min. As secções foram lavadas com água e contrastadas com hematoxilina durante 5 min e montadas.

Análise Estatística. As medições dos tumores *in vivo* em mm³ são expressas como média ± EP. As diferenças entre os

grupos de tratamento a dados momentos foram testadas quanto à significância estatística utilizando teste t de Student.

RESULTADOS

Ligaçāo dos Anticorpos às Linhas Celulares. Para determinar a especificidade do mAb 806, foi analisada a sua ligação a células U87 MG, U87 MG.D2-7 e U87 MG.wtEGFR através de FACS. Um IgG2b irrelevante (mAb 100-310 dirigido ao antígeno humano A33) foi incluído como controlo do isotipo para mAb 806 e o anticorpo 528 foi incluído porque reconhece tanto EGFR wt como de2-7. Apenas o anticorpo 528 foi capaz de corar a linha celular parental U87 MG (**Figura 29**), consistente com relatórios anteriores demonstrando que estas células expressam o EGFR wt (16). O mAb 806 tinha níveis de ligação semelhantes aos do anticorpo de controlo, demonstrando claramente que é incapaz de se ligar ao EGFR wt (**Figura 29**). A ligação do anticorpo de controlo do isotipo às linhas celulares U87 MG.D2-7 e U87 MG.wtEGFR foi semelhante à observada para as células U87 MG. O mAb 806 corou células U87 MG.D2-7 e U87 MG.wtEGFR, indicando que o mAb 806 reconheceu especificamente o EGFR de2-7 e um subconjunto do EGFR sobre-expresso (**Figura 29**). Tal como esperado, o anticorpo 528 corou tanto a linha celular U87 MG.D2-7 como U87 MG.wtEGFR (**Figura 29**). A intensidade da coloração do anticorpo 528 em células U87 MG.wtEGFR foi muito superior à de mAb 806, sugerindo que o mAb 806 apenas reconhece uma porção do EGFR sobre-expresso. A reatividade do mAb 806 observada com células U87 MG.wtEGFR é semelhante à obtida com células A431, outra linha celular que sobre-expressa o EGFR wt.³

Foi efetuada uma análise Scatchard utilizando células U87 MG.D2-7 e A431 para determinar a afinidade relativa e os locais de ligação para mAb 806 em cada linha celular. O mAb 806 tinha uma afinidade de ligação para o recetor EGFR de2-7 de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ e reconheceu uma média (três experiências separadas) de $2,4 \times 10^5$ locais de ligação/célula. Em contraste, a afinidade do mAb 806 para o EGFR wt em células A431 foi de apenas $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Interessantemente, o mAb 806 reconheceu $2,3 \times 10^5$ locais de ligação à superfície de A431, que é umas 10 vezes inferior ao número relatado de EGFR encontrado nestas células. Para confirmar o número de EGFR à superfície das

nossas células A431, efetuámos uma análise Scatchard utilizando anticorpo 528 marcado com ^{125}I . Tal como esperado, este anticorpo ligou-se a aproximadamente 2×10^6 locais à superfície das células A431. Assim, parece que o mAb 806 apenas se liga a uma porção dos receptores EGFR à superfície das células A431. Importantemente, o mAb 806 marcado com ^{125}I não se ligou às células U87 MG parentais de todo, mesmo quando o número de células foi aumentado até 1×10^7 .

Imunoprecipitações. Caracterizámos ainda a reatividade do mAb 806 nas várias linhas celulares através de imunoprecipitação após marcação com ^{35}S utilizando o mAb 806, sc-03 (um anticorpo policlonal comercial específico para o domínio COOH-terminal do EGFR) e um controlo do isotipo IgG2b. O anticorpo sc-03 imunoprecipitou três bandas a partir das células U87 MG. 2-7, um duplo correspondendo às 2 bandas de EGFR de2-7 observadas nestas células e uma banda de peso molecular mais elevado correspondendo ao EGFR wt (**Figura 30**). Em contraste, embora o mAb 806 tenha imunoprecipitado as 2 bandas de EGFR de2-7, o EGFR wt estava completamente ausente (**Figura 30**). O padrão observado em células U87 MG.wtEGFR e A431 foi essencialmente idêntico. O anticorpo sc-03 imunoprecipitou uma única banda correspondendo ao EGFR wt de ambas as linhas celulares (**Figura 30**). O mAb 806 também imunoprecipitou uma única banda correspondendo ao EGFR wt de ambas as células U87 MG.wtEGFR e A431 (**Figura 30**). Consistente com os dados de FACS e de Scatchard, a quantidade de EGFR imunoprecipitada pelo mAb 806 foi substancialmente inferior à do EGFR total presente à superfície celular. Dado que o mAb 806 e o sc-03 imunoprecipitaram quantidades semelhantes de EGFR de2-7, este resultado apoia a noção de que o anticorpo mAb 806 apenas reconhece uma porção do EGFR em células que sobre-expressam o receptor. As comparações entre o mAb 806 e o anticorpo 528 mostraram um padrão de reatividade idêntico (dados não mostrados). Um IgG2b irrelevante (um controlo do isotipo para mAb 806) não imunoprecipitou EGFR a partir de nenhuma das linhas celulares (**Figura 30**). Utilizando condições idênticas, o mAb 806 não imunoprecipitou o EGFR a partir das células U87MG parentais (dados não mostrados).

Eficácia do mAb 806 em Modelos Preventivos. O mAb 806 foi examinado quanto à eficácia contra tumores U87 MG e

U87 MG. 2-7 num modelo preventivo de xenoenxerto. O anticorpo ou veículo foi administrado i.p. no dia antes da inoculação do tumor e foi dado três vezes por semana durante 2 semanas (ver "Materiais e Métodos"). A uma dose de 1 mg/injeção, o mAb 806 não teve efeito no crescimento de xenoenxertos U87 MG parentais que expressam o EGFR wt (**Figura 9A**). Em contraste, o mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos U87 MG. 2-7 de um modo dependente da dose (**Figura 9B**). Vinte dias após a inoculação do tumor, quando os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio foi de $1600 \pm 180 \text{ mm}^3$ para o grupo de controlo, um significativamente menor $500 \pm 95 \text{ mm}^3$ para o grupo de 0,1 mg/injeção ($P<0,0001$) e $200 \pm 42 \text{ mm}^3$ para o grupo de 1 mg/injeção ($P<0,0001$). Os grupos de tratamento foram sacrificados no dia 24, momento ao qual os volumes médios dos tumores foram de $1300 \pm 240 \text{ mm}^3$ para o grupo de tratados com 0,1 mg e $500 \pm 100 \text{ mm}^3$ para o grupo de 1 mg ($P<0,005$).

Eficácia de mAb 806 em Modelos de Xenoenxerto

Estabelecido. Dada a eficácia do mAb 806 no modelo preventivo de xenoenxerto, foi examinada a sua capacidade para inibir o crescimento de xenoenxertos tumorais estabelecidos. O tratamento de anticorpo foi tal como descrito no modelo preventivo, exceto que começou quando os tumores tinham alcançado um volume tumoral médio de 65 mm^3 (10 dias após a implantação) para os xenoenxertos U87MG. -2 e 84 mm^3 (19 dias após a implantação) para os xenoenxertos U87 MG parentais. Novamente, o mAb 806 não teve efeito no crescimento dos xenoenxertos U87 MG parentais mesmo a uma dose de 1 mg/injeção (**Figura 10A**). Em contraste, o mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos U87 MG. 2-7 de um modo dependente da dose (**Figura 10B**). No dia 17, um dia antes os animais de controlo terem sido sacrificados, o volume tumoral médio era de $900 \pm 200 \text{ mm}^3$ para o grupo de controlo, $400 \pm 60 \text{ mm}^3$ para o grupo de 0,1 mg/injeção ($p<0,01$) e $220 \pm 60 \text{ mm}^3$ para o grupo de 1 mg/injeção ($p<0,002$). O tratamento de xenoenxertos U87 MG. 2-7 com um controlo do isotipo IgG2b não teve qualquer efeito no crescimento tumoral (dados não mostrados).

Para examinar se a inibição do crescimento observada com o mAb 806 estava restringida a células expressando EGFR de 2-7,

a sua eficácia contra os xenoenxertos U87 MG.wtEGFR foi também examinada num modelo estabelecido. Estas células servem como modelo para tumores contendo amplificação do gene *EGFR* sem expressão de EGFR de2-7. O tratamento de mAb 806 começou quando os tumores tinham alcançado um volume tumoral médio de 73 mm³ (22 dias após a implantação). O mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos U87 MG.wtEGFR estabelecidos quando comparado com tumores de controlo tratados com veículo (**Figura 10C**). No dia em que os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio era de 1000 ± 300 mm³ para o grupo de controlo e 500 ± 80 mm³ para o grupo tratado com 1 mg/injeção ($P<0,04$).

Análise Histológica e Imuno-histoquímica dos Tumores

Estabelecidos. Para avaliar potenciais diferenças histológicas entre os xenoenxertos U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR tratados com mAb 806 e de controlo, fixados em formalina e impregnados em parafina, foram coradas secções com H&E (**Figura 31**). Áreas de necrose foram observadas em secções de U87MG. 2-7 tratadas com mAb 806 (os xenoenxertos tratados com mAb 806 foram colhidos 24 dias após a inoculação do tumor e os xenoenxertos tratados com veículo aos 18 dias) e em xenoenxertos U87 MG.wtEGFR (os xenoenxertos tratados com mAb 806 foram colhidos 42 dias após a inoculação do tumor e os xenoenxertos tratados com veículo aos 37 dias; **Figura 31**). Este resultado foi consistentemente observado em vários xenoenxertos de tumores (n=4 para cada linha celular). No entanto, secções de xenoenxertos U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR tratados com veículo (n=5) não mostraram as mesmas áreas de necrose observadas com o tratamento de mAb 806 (**Figura 31**). Os xenoenxertos tratados com veículo e mAb 806 removidos a momentos idênticos mostraram também estas diferenças na necrose tumoral (dados não mostrados). Assim, o aumento da necrose observada não foi causado pelos maiores períodos de crescimento utilizados para os xenoenxertos tratados com mAb 806. Para além disso, secções de xenoenxertos U87 MG tratados com mAb 806 foram também coradas com H&E e não revelaram nenhuma área de necrose (dados não mostrados), apoiando ainda a hipótese de que a ligação do mAb 806 induz menor viabilidade celular, resultando em maior necrose dentro dos xenoenxertos tumorais.

Foi efetuada uma análise imuno-histoquímica de secções de xenoenxertos U87 MG, U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR para determinar os níveis de expressão de EGFR wt e de2-7 após tratamento com mAb 806 (**Figura 32**). Tal como esperado, o anticorpo 528 corou todas as secções de xenoenxerto sem diminuição óbvia na intensidade entre os tumores tratados e de controlo (**Figura 32**). A coloração de secções de U87 MG foi indetectável com o mAb 806; no entanto, foi observada coloração positiva de secções dos xenoenxertos U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR (**Figura 32**). Não houve diferença na intensidade da coloração de mAb 806 entre os xenoenxertos U87 MG. 2-7 e U87 MG.wtEGFR de controlo e tratados, sugerindo que o tratamento com anticorpo não conduziu à seleção de variantes clonais sem reatividade com o mAb 806.

Tratamento de Xenoenxertos A431 com mAb 806. Para demonstrar que os efeitos antitumorais de mAb 806 não estavam restringidos a células U87 MG, o anticorpo foi administrado a ratinhos contendo xenoenxertos A431. Estas células contêm um gene *EGFR* amplificado e expressam aproximadamente 2×10^6 receptores/célula. Mostrámos anteriormente que o mAb 806 se liga a ~10% destes EGFR e alveja xenoenxertos A431.³ O mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos A431 quando examinado no modelo de xenoenxerto preventivo descrito anteriormente (**Figura 11A**). No dia 13, quando os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio era de $1400 \pm 150 \text{ mm}^3$ no grupo tratado com veículo e $260 \pm 60 \text{ mm}^3$ para o grupo de tratamento com 1 mg/injeção ($P < 0,0001$). Numa experiência em separado, uma dose de 0,1 mg de mAb também inibiu significativamente ($P < 0,05$) o crescimento de xenoenxertos A431 num modelo preventivo (dados não mostrados).

Dada a eficácia do mAb 806 no modelo preventivo de xenoenxerto A431, foi examinada a sua capacidade para inibir o crescimento de xenoenxertos tumorais estabelecidos. O tratamento de anticorpo foi tal como descrito no modelo preventivo, exceto que não foi iniciado até os tumores terem alcançado um volume tumoral médio de $200 \pm 20 \text{ mm}^3$. O mAb 806 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos A431 estabelecidos (**Figura 11B**). No dia 13, o dia em que os animais de controlo foram sacrificados, o volume tumoral médio foi de

1100 \pm 100 mm³ para o grupo de controlo e 450 \pm 70 mm³ para o grupo de 1 mg/injeção ($P<0,0001$).

Mostrámos anteriormente³ que o mAb 806 alveja tanto xenoenxertos U87 MG transfetados com EGFR de2-7 como xenoenxertos A431 que sobre-expressam o EGFR wt. O mAb 806 não alvejou as células U87 MG parentais, que expressam ≈ 10 EGFR³ (16). Tal como avaliado através de FACS, imuno-histoquímica e imunoprecipitação, demonstramos agora que o mAb 806 é também capaz de se ligar especificamente a células U87 MG.wtEGFR, que expressam $>10^6$ EGFR/célula. Assim, a ligação anteriormente observada do mAb 806 a células A431 não é o resultado de alguma propriedade invulgar destas células mas em vez disso parece ser um fenómeno mais geral relacionado com a sobre-expressão do EGFR wt.

(a) Fomos incapazes de detetar ligação de mAb 806 à linha celular U87 MG parental, que expressa 1×10^5 EGFR wt/célula (16), através de FACS, imunoprecipitação, imuno-histoquímica ou com anticorpo iodado. De facto, o mAb 806 iodado não se ligou aos sedimentos de células U87 MG contendo 1×10^7 células, que com base nos dados de Scatchard utilizando 1×10^6 células A431, é uma condição que deve detetar um baixo nível de ligação do anticorpo (i.e., sendo o número total de receptores semelhante em ambos os casos).

(b) A análise Scatchard mostrou claramente que o mAb 806 apenas se ligou a 10% dos EGFR totais à superfície das células A431. Se o mAb 806 se liga simplesmente ao EGFR wt com baixa afinidade, então deve ter uma percentagem consideravelmente mais elevada do recetor.

(c) A imunoprecipitação comparativa das linhas celulares A431 e U87 MG.wtEGFR com mAb 806 e o anticorpo sc-03 também apoiou a hipótese de que apenas um subconjunto de receptores é reconhecido pelo mAb 806. Tomados em conjunto, estes resultados apoiam a noção de que o mAb 806 reconhece um subconjunto de EGFR à superfície de células que sobre-expressam o EGFR. Estamos atualmente a analisar o EGFR imunoprecipitado pelo mAb 806 para ver se apresenta propriedades bioquímicas alteradas relacionadas com glicosilação ou atividade de quinase.

Os estudos de xenoenxertos com mAb 806 aqui descritos demonstram uma inibição dependente da dose do crescimento dos xenoenxertos U87 MG.D2-7. Em contraste, não foi observada inibição dos xenoenxertos U87 MG parentais, apesar do facto de eles continuarem a expressar o EGFR wt *in vivo*. O mAb 806 não só reduziu significativamente o volume do xenoenxerto, como também induziu necrose significativa dentro do tumor. Tal como observado acima, foram gerados outros mAb específicos de EGFR de2-7 (20-22), mas este é o primeiro relatório mostrando a utilização terapêutica com sucesso de um tal anticorpo *in vivo* contra um xenoenxerto de glioma humano expressando EGFR de2-7. Um relatório recente demonstrou que o mAb Y10 específico de EGFR de2-7 tinha uma atividade antitumoral *in vivo* contra células de melanoma B16 de murídeo transfectadas com um homólogo de murídeo do EGFR de2-7 humano (33). Y10 mediou lise celular *in vitro* (>90%) de células de melanoma B16 expressando o EGFR de2-7 na ausência de complemento ou de células efectoras. Em contraste com as suas observações *in vitro*, a eficácia do anticorpo Y10 *in vivo* foi completamente mediada através da função Fc quando se utiliza células de melanoma B16 criadas como xenoenxertos num modelo imunocompetente. Assim, os efeitos diretos observados *in vitro* não parecem ser replicados quando as células são criadas como xenoenxertos tumorais.

A sobre-expressão do EGFR foi relatada em vários tumores diferentes e é observada na maioria dos gliomas (4,14). Foi proposto que a subsequente sobre-expressão de EGFR mediada pela amplificação do gene do recetor pode conferir uma vantagem de crescimento através do aumento da sinalização intracelular e do crescimento celular (34). A linha celular U87 MG foi transfectada com o EGFR wt para produzir uma célula de glioma que imita o processo de amplificação do gene EGFR. O tratamento de xenoenxertos U87 MG.wtEGFR estabelecidos com mAb 806 resultou numa inibição significativa do crescimento. Assim, o mAb 806 medeia também a atividade antitumoral *in vivo* contra células que sobre-expressam o EGFR. É interessante que, a inibição do mAb 806 dos xenoenxertos U87 MG.wtEGFR foi menos pronunciada que a observada com tumores U87 MG. 2-7. Isto provavelmente reflete o facto de o mAb 806 ter uma menor afinidade para o EGFR wt sobre-expresso e se ligar apenas a uma pequena proporção de recetores expressos na superfície

celular.(3) No entanto, deve notar-se que apesar do pequeno efeito no volume dos xenoenxertos U87 MG.wtEGFR, o tratamento com mAb 806 produziu grandes áreas de necrose dentro destes xenoenxertos. Para excluir a possibilidade do mAb 806 mediar apenas a inibição das linhas celulares derivadas de U87 MG, testámos a sua eficácia contra xenoenxertos A431. Esta linha celular derivada de carcinoma de células escamosas contém uma significativa amplificação do gene *EGFR*, que é mantida tanto *in vitro* como *in vivo*. O tratamento dos xenoenxertos A431 com mAb 806 produziu uma inibição significativa do crescimento tanto num modelo preventivo como no estabelecido, indicando que os efeitos antitumorais do mAb 806 não estão restringidos a linhas celulares U87 MG transfectadas.

A prevenção completa do crescimento do xenoenxerto A431 através de tratamento de anticorpos foi relatada anteriormente. Os mAb de EGFR wt 528, 225 e 425 preveniram todos a formação de xenoenxertos A431 quando administrados no dia ou 1 dia após a inoculação do tumor (9,10). A razão para esta diferença na eficácia entre estes anticorpos de EGFR wt e o mAb 806 não é conhecida mas pode estar relacionada com o mecanismo de inibição do crescimento celular. Os anticorpos de EGFR wt funcionam através do bloqueio da ligação do ligando ao EGFR, mas isto não é provavelmente o caso com o mAb 806 porque este se liga apenas a um pequeno subconjunto de EGFR à superfície de células A431. A eficácia significativa do mAb 806 contra células U87 MG expressando o EGFR de 2-7 independentemente do ligando apoia ainda a noção de que este antícorpo medeia a sua atividade antitumoral através de um mecanismo que não envolve bloqueio do ligando. Por essa razão, estamos atualmente a investigar os mecanismos não imunológicos e imunológicos que contribuem para os efeitos antitumorais do mAb 806. Os mecanismos não imunológicos podem incluir alterações sutis no nível dos receptores, bloqueio da sinalização ou indução de sinalização inapropriada.

Anteriormente, agentes tais como doxorrubicina e cisplatina em conjunto com anticorpos de EGFR wt produziram maior atividade antitumoral (35,36). A combinação de doxorrubicina com mAb 528 resultou na erradicação total de xenoenxertos A431 estabelecidos enquanto o tratamento com um dos agentes sozinho causou apenas a inibição temporária do

crescimento *in vivo* (36). Igualmente, a combinação de cisplatina com mAb 528 ou 225 também conduziu à erradicação de xenoenxertos A431 bem estabelecidos, o que não foi observado quando foi utilizado o tratamento com um dos agentes (35). Assim, estão planeados estudos futuros envolvendo a combinação de agentes quimioterapêuticos com mAb 806 utilizando modelos de xenoenxerto.

Talvez a vantagem mais importante do mAb 806 em comparação com os atuais anticorpos de EGFR é que poderia ser possível conjugar diretamente agentes citotóxicos ao mAb 806. Esta abordagem não é praticável com os atuais anticorpos específicos de EGFR porque estes alvejam o fígado e a conjugação citotóxica induziria quase de certeza toxicidade grave. A conjugação de agentes citotóxicos tais como fármacos (37) ou radioisótopos (38) aos anticorpos tem o potencial de melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade sistémica destes agentes. Este estudo demonstra claramente que o mAb 806 tem atividade antitumoral significativa *in vivo* contra xenoenxertos positivos para EGFR de 2-7 e tumores que sobre-expressam o EGFR. A especificidade única do mAb 806 sugere potencial imunoterapêutico a alvejar vários tipos de tumores, particularmente tumores da cabeça e pescoço e glioma, sem as restrições associadas à tomada por tecido normal.

REFERÊNCIAS

1. Scott, A. M., e Welt, S. Antibody-based immunological therapies. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 717-722, 1997.
2. Fan, Z., e Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67-73, 1998.
3. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., e Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.
4. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., e Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.

5. Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., e Pronin, I. Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J. Clin. Pathol.*, 52: 574-580, 1999.
6. Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., e Twardy, D. J. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 824-832, 1998.
7. Fan, Z., Masui, H., Altas, I., e Mendelsohn, J. Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 53: 4322-4328, 1993.
8. Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., e Asano, G. Inhibitory effect of anti-epidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer. *Cancer (Phila.)*, 77: 1639-1645, 1996.
9. Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varelo, M., Steplewski, Z., e Koprowski, H. Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects. *Cancer Res.*, 47: 3692-3696, 1987.
10. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., e Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 44: 1002-1007, 1984.
11. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Groppe, P., Poisson, M., e Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery*, 39: 478-483, 1996.
12. Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., et al. Phase I and imaging trial of indium 11-

labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 97-104, 1991.

13. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., e Mendelsohn, J. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J. Clin. Oncol.*, 18: 904, 2000.

14. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., e Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.*, 8: 1197-1206, 1997.

15. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., e Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8602-8606, 1990.

16. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., e Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727-7731, 1994.

17. Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., e Lippman, M. E. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res.*, 60: 3081-3087, 2000.

18. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., e Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186-194, 2000.

19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., e Wong, A. J. Frequent expression of a mutant

epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536-5539, 1995.

20. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.*, 55: 3140-3148, 1995.

21. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., e Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated FGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, 63: 537-543, 1995.

22. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., e Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer*, 73: 1366-1372, 1996.

23. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., e Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56: 5079-5086, 1996.

24. Sato, J. D., Le, A. D., e Kawamoto, T. Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. *Methods Enzymol.*, 146: 63-81, 1987.

25. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., e Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927-2935, 1997.

26. Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., e Scott, A. M. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer

model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3621-3628, 2000.

27. Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., e Kumar, R. Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor α . *Cancer Res.*, 52: 3335-3339, 1992.

28. Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos, C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., et al. Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852. *J. Clin. Oncol.*, 12: 730-739, 1994.

29. Wersäll, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., Mellstedt, H., e Boethius, J. Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 157-164, 1997.

30. Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., et al. Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase II trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22: 225-230, 1992.

31. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., e Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-celllobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.*, 55: 4375-4382, 1995.

32. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., e Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-

succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.*, 57: 1510-1515, 1997.

33. Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., e Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.

34. Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., e Buick, R. N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 251-257, 1987.

35. Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., e Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.

36. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., Jr., e Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1327-1333, 1993.

37. Trail, P. A., e Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.

38. DeNardo, S. J., Kroger, L. A., e DeNardo, G. L. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 563-569, 1999.

EXEMPLO 21

CONSTRUÇÃO, EXPRESSÃO E ANÁLISE DO ANTICORPO QUIMÉRICO 806

Os anticorpos quiméricos são uma classe de moléculas em que as regiões variáveis da cadeia pesada e leve de, por exemplo, um ratinho, rato ou outra espécie, são unidas a regiões da cadeia pesada e leve humanas. Os anticorpos quiméricos são produzidos de forma recombinante. Uma vantagem dos anticorpos quiméricos é que podem reduzir os efeitos xeno-

antigénicos, a imunogenicidade inerente dos anticorpos não humanos (por exemplo, de ratinho, rato ou outras espécies). Adicionalmente, os anticorpos quiméricos preparados de modo recombinante podem ser frequentemente produzidos em grandes quantidades, particularmente quando se utiliza um vetor de elevado nível de expressão.

Para a produção de elevado nível, o sistema de expressão de mamífero mais amplamente utilizado é um que utiliza o procedimento de amplificação génica oferecido pelas células de ovário de hamster chinês deficientes na desidrofolato-redutase ("dhfr"). O sistema é bem conhecido dos peritos. O sistema baseia-se no gene da desidrofolato-redutase "dhfr", que codifica a enzima DHFR, que catalisa a conversão do desidrofolato em tetra-hidrofolato. Para alcançar elevada produção, células CHO dhfr- são transfectadas com um vetor de expressão contendo um DHFR funcional, juntamente com um gene que codifica uma proteína desejada. Neste caso, a proteína desejada é uma cadeia pesada e/ou cadeia leve de um anticorpo recombinante.

Aumentando a quantidade do inibidor competitivo da DHFR metotrexato (MTX), as células recombinantes desenvolvem resistência através de amplificação do gene *dhfr*. Em casos padrão, a unidade de amplificação empregue é muito maior que o tamanho do gene *dhfr* e em resultado disso a cadeia pesada do anticorpo é co-amplificada.

Quando se deseja produção em larga escala da proteína, tal como a cadeia de anticorpo, tanto o nível de expressão como a estabilidade das células a empregar, são críticos. Em cultura a longo prazo, as populações de células CHO recombinantes perdem homogeneidade em relação à sua produtividade do anticorpo específico durante a amplificação, apesar de derivarem de um único clone parental.

Foram preparados vetores de expressão bicistrónicos para utilizar em expressão recombinante dos anticorpos quiméricos. Estes vetores de expressão bicistrónicos empregam um "local de entrada no ribossoma interno" ou "IRES." Nestas construções para produção de anti-EGFR quimérico, as cadeias de imunoglobulina e os ADNc marcadores selecionáveis são ligados

através de um IRES. Os IRES são elementos de ação em *cis* que recrutam as subunidades ribossómicas pequenas para um codão iniciador interno no ARNm com o auxílio de fatores celulares de ação em *trans*. O IRES facilita a expressão de duas ou mais proteínas a partir de uma unidade de transcrição policistrónica em células eucarióticas. A utilização de vetores de expressão bicistrónicos nos quais o gene marcador seleccionável é traduzido de um modo dependente de proteção (*cap*) e o gene de interesse de um modo dependente do IRES, foi aplicada a uma variedade de métodos experimentais. Os elementos IRES foram incorporados com sucesso em vetores para transformação celular, produção de animais transgénicos, produção de proteínas recombinantes, terapia génica, aprisionamento de genes e direcionamento para genes.

Sinopse da Construção do Anticorpo Quimérico 806 (ch806)

O anticorpo 806 quimérico foi gerado através de clonagem da VH e VL do anticorpo 806 a partir do hibridoma parental de murídeo utilizando técnicas padrão de biologia molecular. A VH e a VL foram então clonadas nos vetores de expressão de mamífero PREN, cuja construção está exposta em SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8 e transfectadas para células CHO (DHFR -/-ve) para amplificação e expressão. Resumidamente, após tripsinização 4×10^6 células CHO foram co-transferidas com 10 µg de cada um dos vetores de expressão LC e HC utilizando electroporação sob condições padrão. Após um período de repouso de 10 min à temperatura ambiente, as células foram adicionadas a 15 ml de meio (soro fetal de vitelo a 10%, suplemento de hipoxantina/timidina com aditivos) e transferidas para caixas de Petri de cultura de tecidos de 15x10 cm. As placas foram então colocadas na incubadora sob condições normais durante 2 dias. Neste ponto, a adição de gentamicina, metotrexato 5 nM, a substituição do soro fetal de vitelo por soro fetal dialisado e a remoção da hipoxantina/timidina, iniciaram a seleção de clones que foram transfectados com sucesso tanto com o LC como com o HC a partir do meio. No dia 17 após a transfecção, os clones individuais a crescer sob seleção foram apanhados e pesquisados quanto à expressão do anticorpo quimérico 806. Foi utilizado um ELISA para a pesquisa que consistiu em revestimento de uma placa de ELISA com recetor de EGF solúvel desnaturado (sabe-se que o EGFR desnaturado permite a ligação de 806). Este ensaio permite a pesquisa de

níveis de produção pelos clones individuais e também a funcionalidade do anticorpo a pesquisar. Foi mostrado que todos os clones produziam ch806 funcional e o melhor produtor foi tomado e expandido para amplificação. Para amplificar o nível de ch806 a produzir, o clone maior produtor foi sujeito a nova seleção sob uma concentração mais elevada de metotrexato (100 nM vs. 5 nM). Isto foi realizado utilizando os procedimentos acima mencionados.

Os clones a crescer em MTX 100 nM foram então analisados na *Biological Production Facility*, Ludwig Institute, Melbourne, Austrália para medição dos níveis de produção, soro de substituição, amontoamento celular. Foi mostrado que a linha celular produz estavelmente 10 mg/litro em garrafas rolantes.

A sequência de ácido nucleico do vetor pREN ch806 LC neo é proporcionada em SEQ ID NO:7. A sequência de ácido nucleico do vetor pREN ch806 HC DHFR é proporcionada em SEQ ID NO:8.

A **Figura 33** representa os vetores pREN-HC e pREN-LC, que empregam um IRES. O sistema vetor bicistrónico pREN é descrito e divulgado no U.S.S.N. co-pendente 60/355,838 apresentado a 13 de Fevereiro de 2002.

Ch806 foi avaliado através da análise FACS para demonstrar que o 806 quimérico apresenta especificidades de ligação idênticas às do anticorpo parental de murídeo. A análise foi efetuada utilizando células de tipo selvagem (células parentais U87 MG), células que sobre-expressam o recetor de EGF (células A431 e células UA87wtEGFR) e células UA87 2-7 (dados não mostrados). A especificidade de ligação semelhante do mAb 806 e ch806 foi obtida utilizando células que sobre-expressam EGFR e células expressando o EGFR de2-7. Não foi observada ligação em células de tipo selvagem. A análise Scatchard revelou uma afinidade de ligação para ch806 radiomarcado de $6,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ utilizando células U87MGde2-7 (dados não mostrados).

A análise da biodistribuição do anticorpo ch806 foi efetuada em ratinhos nus BALB/c possuindo xenoenxertos tumorais U87MG-de2-7 e os resultados são mostrados na

Figura 34. Os ratinhos foram injetados com 5 µg de anticorpo radiomarcado e foram sacrificados em grupos de quatro por cada tempo às 8, 24, 48 e 74 horas. Os órgãos foram colhidos, pesados e a radioatividade foi medida num contador gama. O ch806 marcado com ^{125}I apresenta reduzido direcionamento para o tumor em comparação com o ch806 marcado com ^{111}In , que tem uma elevada tomada pelo tumor e uma retenção cumulativa pelo tumor para além do período de tempo de 74 horas. Às 74 horas, o anticorpo marcado com ^{111}In apresenta aproximadamente 30% ID/grama de tecido e uma razão de tumor para sangue de 4,0 (**Figura 35**). O ch806 marcado com ^{111}In mostra alguma retenção não específica no fígado, baço e rins. Isto é vulgar para a utilização deste isótopo e diminui com o tempo, o que apoia que esta ligação seja não específica de ch806 e devida à ligação de ^{111}In .

O anticorpo quimérico ch806 foi avaliado quanto à eficácia terapêutica num modelo de tumor estabelecido. 3×10^6 células U87MG. 2-7 em 100 µl de PBS foram inoculadas s.c. em ambos os flancos de ratinhos nus fêmea com 4-6 semanas de idade (Aminal Research Center, Western Australia, Austrália). O mAb 806 foi incluído como controlo positivo. Os resultados são representados na **Figura 36**. O tratamento foi iniciado quando os tumores tinham alcançado um volume médio de 50 mm³ e consistiu em 1 mg de ch806 ou mAb 806 dado i.p. durante um total de 5 injeções nos dias indicados. O volume do tumor em mm³ foi determinado utilizando a fórmula (comprimento × largura²)/2, onde o comprimento era o eixo mais longo e largura a medição perpendicular ao comprimento. Os dados foram expressos como volume tumoral médio ± EP, para cada grupo de tratamento. O ch806 e o mAb 806 apresentaram atividade antitumoral quase idêntica contra xenoenxertos U87MG. -2.

Análise da Função Efectora Imunitária de Ch806

Materiais e Métodos

Anticorpos e Linhas Celulares:

O anticorpo monoclonal anti-EGFR de2-7 mAb 806, anticorpo quimérico ch806 (IgG₁) e anticorpo monoclonal quimérico anti-G250 de controlo do mesmo isotipo, foram preparados pela *Biological Production Facility*, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Austrália. Ambos os ensaios de

citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) utilizaram células U87MG.de2-7 e A431 como células alvo. A linha celular anteriormente descrita U87MG.de2-7 é uma linha celular de astrocitoma humano infetada com um retrovírus contendo o EGFR de2-7 (Nishikawa, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7727-31, 1994). As células de carcinoma escamoso humano A431 foram adquiridas em *American Type Culture Collection* (Manassas, VA). Todas as linhas celulares foram cultivadas em DMEM/F-12 com Glutamax™ (Life Technologies, Melbourne, Austrália) suplementado com FCS termo-inativado a 10% (CSL, Melbourne, Austrália), 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Para manter a seleção de células U87MG.de2-7 retroviralmente transfectadas, foram incluídos no meio 400 µg/ml de G418.

Preparação de Células Efectoras, células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC):

As PBMC foram isoladas a partir de sangue de dadores voluntários saudáveis. O sangue completo heparinizado foi fracionado por centrifugação de densidade em Ficoll-Hypaque (ICN Biomedical Inc., Ohio, EUA). As frações de PBMC foram colhidas e lavadas três vezes com RPMI⁺ 1640 suplementado com 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, L-glutamina 2 mM, contendo FCS termo-inativado a 5%.

Preparação das Células Alvo:

Ensaios de CDC e ADCC foram efetuados através de uma modificação de um método anteriormente publicado (Nelson, D.L. et al., 1991, Em: J.E. Colignan, A.M. Kruisbeek, D.D. Margulies, E.M. Shevach e W. Strober (eds.), "Current Protocols in Immunology", pág. 7.27.1. New York: Greene Publishing Wiley Interscience). Resumidamente, 5×10^6 células alvo U87MG.de2-7 e A431 foram marcadas com 50 µCi de ⁵¹Cr (Geneworks, Adelaide, Austrália) por 1×10^6 células e incubou-se durante 2 h a 37°C. As células foram então lavadas três vezes com PBS (0,05 M, pH 7,4) e uma quarta vez com meio de cultura. Foram adicionadas aliquotas (1×10^4 células/50 µl) das células marcadas a cada placa de microtitulação de 96 poços (NUNC, Roskilde, Dinamarca).

Ensaio de CDC:

A 50 μ l de células alvo marcadas, foram adicionados 50 μ l de ch806 ou anticorpo de controlo do isotipo cG250 em triplicado ao longo do intervalo de concentrações 0,00315-10 μ g/ml e incubou-se em gelo 5 min. Foram então adicionados 50 μ l de complemento (soro) de dador saudável preparado de fresco para dar uma diluição final de 1:3 do soro. As placas de microtitulação foram incubadas durante 4 h a 37°C. Após centrifugação, o ^{51}Cr libertado no sobrenadante foi contado (Contador Gama automático Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Austrália). A percentagem de lise específica foi calculada a partir da libertação experimental de ^{51}Cr , a libertação total (50 μ l de células alvo + 100 μ l de Tween 20 a 10%) e espontânea (50 μ l de células alvo + 100 μ l de meio).

Ensaio de ADCC:

A ADCC mediada por Ch806 efetuada por PBMC de um dador saudável foi medida através de dois ensaios de libertação de ^{51}Cr de 4 h. No primeiro ensaio, as células alvo marcadas foram plaqueadas com as células efectoras em microplacas de fundo em "U" de 96 poços (NUNC, Roskilde, Dinamarca) a razões de células efectoras/alvo (E:A) de 50:1. Para medições da atividade ADCC, 0,00315-10 μ g/ml (concentração final) os anticorpos de teste e de controlo foram adicionados em triplicado a cada poço. No segundo ensaio ADCC, a atividade ADCC de ch806 foi comparada com a do mAb 806 de murídeo parental ao longo de um intervalo de razões células Efetoras:Alvo com a concentração do anticorpo de teste constante a 1 μ g/ml. Em ambos os ensaios, as placas de microtitulação foram incubadas a 37°C durante 4 horas, depois foram colhidos 50 μ l de sobrenadante de cada poço e o ^{51}Cr libertado foi determinado através de contagem gama (Contador Gama automático Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Austrália). Os controlos incluídos nos ensaios corrigiram para a libertação espontânea (apenas meio) e para a libertação total (Tween 20 a 10%/PBS). Controlos apropriados com anticorpo da mesma subclasse foram corridos em paralelo.

A percentagem de lise celular (citotoxicidade) foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Percentagem de Citotoxicidade} = \frac{\text{Contagens da Amostra-Libertação Espontânea}}{\text{Libertação Total-Libertação Espontânea}} \times 100$$

A percentagem (%) de citotoxicidade foi representada versus a concentração do anticorpo ($\mu\text{g/ml}$).

Resultados

Os resultados das análises à CDC são apresentados na **Figura 37**. A atividade de CDC mínima foi observada na presença de até 10 $\mu\text{g/ml}$ de ch806 com CDC comparável à observada com o cG250 de controlo do isotipo.

A ADCC mediada por Ch806 em células alvo U87MG.de2-7 e A431 a uma razão E:A de 50:1 é apresentada na **Figura 38**. A citotoxicidade específica de ch806 eficaz foi apresentada contra células alvo U87MG.de2-7, mas a ADCC mínima foi mediada por ch806 em células A431. Os níveis de citotoxicidade alcançados refletem o número de locais de ligação de ch806 nas duas populações celulares. As células alvo U87MG.de2-7 expressam 1×10^6 EGFR de2-7 que são reconhecidos especificamente por ch806, enquanto apenas um subconjunto das 1×10^6 moléculas EGFR de tipo selvagem expressas nas células A431 é reconhecido por ch806 (ver Exemplos acima).

Foram efetuadas mais análises de ADCC para comparar a ADCC mediada por 1 $\mu\text{g/ml}$ de ch806 em células alvo U87MG.de2-7 com a efetuada através de 1 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 806 parental de murídeo. Os resultados são apresentados na **Figura 39**. A quimerização do mAb 806 efetuou uma melhoria marcada da ADCC alcançada pelo mAb parental de murídeo com mais de 30% de citotoxicidade efetuada a razões E:A de 25:1 e 50:1.

A falta de função efectora imunitária do mAb 806 parental de murídeo foi marcadamente melhorada após quimerização. O ch806 medeia uma boa ADCC, mas uma atividade de CDC mínima.

EXEMPLO 22

GERAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IDIOTÍPICOS PARA O ANTICORPO QUIMÉRICO ch806

Para ajudar na avaliação clínica do mAb806 ou ch806, são

necessários ensaios laboratoriais para monitorizar a farmacocinética no soro dos anticorpos e quantificar quaisquer respostas imunitárias ao antícorpo quimérico ratinho-humano. Anticorpos monoclonais anti-idiotípicos (anti-id) de ratinho foram gerados e caracterizados quanto à sua adequação como reagentes de ELISA para medir ch806 em amostras de soro de pacientes e utilizar como controlos positivos em análises de respostas imunitárias humanas anti-anticorpo quimérico. Estes anticorpos anti-idiotípicos podem também ser úteis como vacinas terapêuticas ou profiláticas, gerando uma resposta anti-EGFR natural em pacientes.

Os métodos para criação de anticorpos anti-idiotípicos são bem conhecidos na arte (Bhattacharya-Chatterjee, Chatterjee *et al.*, 2001; Uemura *et al.* 1994; Steffens, Boerman *et al.* 1997; Safa e Foon, 2001; Brown e Ling, 1988).

Anticorpos monoclonais de ratinho anti-idiotípicos (anti-id) foram, resumidamente, gerados como se segue. Esplenócitos de ratinhos imunizados com ch806 foram fundidos com células de plasmacitoma SP2/0-AG14 e os hibridomas produtores de anticorpos foram selecionados através de ELISA quanto a ligação específica a ch806 e ligação competitiva ao抗ígeno (**Figura 40**). Foram inicialmente selecionados vinte e cinco hibridomas e quatro, designados LMH-11, 12, 13 e 14, anticorpos segregados que demonstraram ligação específica a ch806, mAb 806 e foram capazes de neutralizar a atividade de ligação ao抗ígeno de ch806 ou mAb 806 (**Figura 41**). O reconhecimento do idiotípico de ch806/mAb 806 ou da região CDR foi demonstrado através da ausência de reatividade cruzada com IgG humana policlonal purificada.

Na ausência de抗ígeno EGFR de2-7 recombinante prontamente disponível para auxiliar na determinação de ch806 em amostras de soro, a capacidade dos novos anticorpos ch806 anti-idiotípicos para se ligar concorrentemente às regiões variáveis de 806 foi explorada no desenvolvimento de um ELISA específico e sensível para medir o ch806 em amostras clínicas (**Figura 42**). Utilizando LMH-12 para captura e LMH-12 Biotinilado para deteção, o ELISA validado demonstrou curvas de ligação altamente reprodutíveis para medição de ch806 (2 µg/ml-1,6 ng/ml) no soro com um limite de deteção de

3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variação <25%; 100 ng/ml - 5 µg/ml, Coeficiente de Variação <15%). Não foi evidente qualquer ligação de fundo com os três soros de dadores saudáveis testados e foi observada ligação desprezável com o hu3S193 de controlo do isotipo. O hibridoma produz elevados níveis de anticorpo LMH-12 e está planeada a produção em mais larga escala para permitir a medição de ch806 e a quantificação de quaisquer respostas imunitárias em amostras clínicas (Brown e Ling, 1988).

RESULTADOS

Imunização de Ratinhos e Seleção de Clones de Hibridoma

A imunorreatividade de amostras de soro pré e pós-imunização indicou o desenvolvimento de um título elevado de mAb de ratinho anti-ch806 e anti-huIgG. Foram inicialmente selecionados vinte e cinco hibridomas produtores de anticorpos que se ligaram a ch806, mas não a huIgG. As características de ligação de alguns destes hibridomas são mostradas na **Figura 42A** e **42B**. Quatro destes hibridomas anti-ch806 com elevada afinidade de ligação (clones 3E3, 5B8, 9D6 e 4D8) foram subsequentemente seguidos para expansão clonal a partir de células individuais através de diluição limitante e designados Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hibridoma (LMH) 11, 12, 13 e 14, respetivamente (**Figura 42**).

Atividades de Ligação e Bloqueio dos Anticorpos anti-idiotípicos Selecionados

A capacidade dos anticorpos anti-ch806 para se ligarem concorrentemente a dois anticorpos ch806 é uma característica desejável para a sua utilização como reagentes num ELISA para determinação dos níveis séricos de ch806. Os hibridomas clonais, LMH-11, 12, 13 e 14 demonstraram ligação concorrente (dados não mostrados).

Após expansão clonal, os sobrenadantes da cultura do hibridoma foram examinados através de ELISA quanto à capacidade para neutralizar a atividade de ligação ao抗igénio de ch806 ou mAb 806 com sEGFR621. Os resultados demonstraram a atividade antagonista dos mAb anti-idiotípicos LMH-11, 12, 13 e 14 com o bloqueio em solução da ligação tanto

de ch806 como do mAb 806 de murídeo a placas revestidas com sEGFR (**Figura 41** para LMH-11, 12, 13).

Após cultura em mais larga escala em garrafas rolantes as especificidades de ligação dos hibridomas clonais estabelecidos, LMH-11, 12, 13 e 14 foram verificadas através de ELISA. Os anticorpos de LMH-11 a 14 foram identificados como do isotipo IgG1 através do estojo de isotipificação de anticorpos monoclonais de ratinho.

ch806 em Amostras Clínicas de Soro: Desenvolvimento do Ensaio ELISA Farmacocinético

Para ajudar na determinação do ch806 em amostras de soro, a capacidade dos anticorpos ch806 anti-idiotípicos para se ligarem concorrentemente à região variável de 806 foi explorada no desenvolvimento de um ensaio ELISA sensível e específico para ch806 em amostras clínicas. Os três clones purificados LMH-11, 12 e 13 (**Figura 49, B e C**, respetivamente) foram comparados quanto à sua capacidade para capturar e depois detetar o ch806 ligado no soro. Os resultados indicados utilizando LMH-12 (10 µg/ml) para captura e LMH-12 biotinilado para deteção produziram a maior sensibilidade para ch806 no soro (3 ng/ml) com ligação de fundo desprezável.

Tendo estabelecido as condições farmacocinéticas de ELISA ótimas utilizando 1 µg/ml de LMH-12 anti-idiotípico e 1 µg/ml de LMH-12 biotinilado para captura e deteção, respetivamente, foi efetuada a validação do método. Foram efetuados três ELISA separados em quadruplicado para medir ch806 em soro de dador de três dadores saudáveis ou BSA a 1%/meio com o controlo do isotipo hu3S193. Os resultados da validação são apresentados na **Figura 43** e demonstram curvas de ligação altamente reprodutíveis para medição de ch806 (2 µg/ml - 1,6 ng/ml) em soros com um limite de deteção de 3 ng/ml (n=12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variação <25%; 100 ng/ml - 5 µg/ml, Coeficiente de Variação <15%). Não foi evidente qualquer ligação de fundo com nenhum dos três soros testados e foi observada ligação desprezável com o controlo do isotipo hu3S193.

REFERÊNCIAS

Estas deveriam estar incorporadas nas do final do Exemplo 17 e postas no final de todos os exemplos.

Brown, G. e N. Ling (1988). Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume 1. A Practical Approach. D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotype vaccines for immunotherapy." Curr Opin Mol Ther 3(1): 63-9.

Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000). "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." Growth Factors 18(1): 11-29

Safa, M. M. e K. A. Foon (2001). "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers." Semin Oncol 28(1): 68-92.

Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994). "Internal image anti-idiotype antibodies related to renal-cell carcinoma-associated antigen G250." Int J Cancer 56(4): 609-14.

EXEMPLO 23**AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS DE HIDRATOS DE CARBONO E RECONHECIMENTO DO ANTICORPO**

Foram realizadas experiências para avaliar melhor o papel das estruturas de hidratos de carbono na ligação e no reconhecimento do EGFR, tanto EGFR amplificado como de2-7, através do anticorpo mAb806.

Para determinar se as estruturas de hidratos de carbono estão diretamente envolvidas no epítopo de mAb 806, o sEGFR recombinante expresso em células CHO foi tratado com PNGase F para remover a glicosilação ligada em N. Após tratamento, a proteína foi corrida em SDS-PAGE, transferida para a membrana e imunoblotted com mAb 806 (**Figura 44**). Tal como esperado, o sEGFR desglicosilado correu mais depressa em SDS-PAGE,

indicando que os hidratos de carbono tinham sido removidos com sucesso. O anticorpo mAb 806 ligou-se claramente ao material desglicosilado demonstrando que o epítopo do anticorpo é de natureza peptídica e não meramente um epítopo de glicosilação.

Lisados, preparados a partir de linhas celulares metabolicamente marcadas com ^{35}S , foram imunoprecipitados com anticorpos diferente dirigidos ao EGFR (**Figura 45**). Tal como esperado, o anticorpo 528 imunoprecipitou 3 bandas a partir de células U87MG. -2, uma banda superior correspondendo ao EGFR de tipo selvagem (wt) e duas bandas inferiores correspondendo ao EGFR de2-7. Estas duas bandas de EGFR de2-7 foram relatadas anteriormente e assume-se que representam glicosilação diferencial (Chu *et al.*, *Biochem. J.*, 15 de Jun., 324(Pt 3): 885-861, 1997). Em contraste, o mAb 806 apenas imunoprecipitou as duas bandas de EGFR de2-7, estando o recetor wt completamente ausente mesmo após sobre-exposição (dados não mostrados). Interessantemente, o mAb 806 mostrou uma reatividade relativamente maior com a banda inferior de EGFR de2-7 mas menor reatividade com a banda superior quando comparado com o anticorpo 528. O anticorpo SC-03, um anticorpo policlonal comercial de coelho dirigido ao domínio C-terminal do EGFR, imunoprecipitou as três bandas de EGFR tal como observado com o anticorpo 528 embora a quantidade total de recetor imunoprecipitado por este anticorpo fosse consideravelmente inferior. Não foram observadas bandas quando se utilizou um anticorpo irrelevante IgG2b como controlo para mAb 806.

O anticorpo 528 imunoprecipitou uma única banda a partir das células U87MG.wtEGFR correspondendo ao recetor wt (**Figura 45**). O mAb 806 também imunoprecipitou uma única banda a partir destas células, no entanto esta banda de EGFR migrou claramente mais depressa que o recetor reativo com 528. O anticorpo SC-03 imunoprecipitou ambas as bandas reativas de EGFR a partir das células U87MG.wtEGFR, confirmado ainda que o mAb 806 e o 528 reconhecem diferentes formas do EGFR em lisados celulares inteiros destas células.

Tal como observado com células U87MG.wtEGFR, o anticorpo 528 imunoprecipitou uma única banda de EGFR a partir das células A431 (**Figura 45**). A banda de EGFR reativa com 528 é

muito ampla nestes géis de baixa percentagem (6%) e reflete provavelmente a diversidade de glicosilação do recetor. Uma única banda de EGFR foi também observada após imunoprecipitação com mAb 806. Ao mesmo tempo esta banda de EGFR não migrou consideravelmente mais rápido que a banda ampla globalmente reativa com 528, situou-se no bordo avançado da banda ampla de 528 de uma forma reproduzível. Ao contrário dos lisados de células U87MG. -2, a quantidade total de EGFR imunoprecipitada pelo mAb 806 a partir dos lisados de A431 foi consideravelmente inferior que com o anticorpo 528, um resultado consistente com os nossos dados de Scatchard mostrando que o mAb 806 apenas reconhece uma porção do EGFR à superfície destas células (ver Exemplo 4 acima). A imunoprecipitação com SC-03 resultou numa única banda ampla de EGFR tal como para o 528. Resultados semelhantes foram obtidos com células HN5 (dados não mostrados). Tomados em conjunto, estes dados indicam que o mAb 806 reage preferencialmente com as espécies de EGFR que migram mais depressa e que podem representar formas diferencialmente glicosiladas do recetor.

Para determinar em que estádio do processamento do recetor surgiu a reatividade do mAb 806, foi conduzida uma experiência de pulso/caça. Células A431 e U87MG. -2 foram pulsadas durante 5 min com 35 S-metionina/cisteína, depois incubadas a 37°C durante vários tempos antes da imunoprecipitação com mAb 806 ou 528 (**Figura 46**). O padrão de imunoprecipitação em células A431 com o anticorpo 528 era típico de um anticorpo dependente da conformação específico para o EGFR. Uma pequena quantidade de recetor foi imunoprecipitada a 0 min (i.e. após um pulso de 5 min) com a uma quantidade crescente de EGFR marcado em cada momento. Houve também um aumento concorrente no peso molecular do recetor com o tempo. Em contraste, o material de EGFR reativo com mAb 806 estava presente a níveis elevados aos 0 min, atingiu um pico aos 20 min e depois reduziu a cada momento posterior. Assim, parece que o mAb 806 reconhece preferencialmente uma forma do EGFR encontrada num estádio inicial do processamento.

A reatividade do anticorpo observada em células U87MG. -2 marcadas com pulso foi mais complicada. A imunoprecipitação com o anticorpo 528 aos 0 min revelou que foi marcada uma

pequena quantidade da banda inferior de EGFR de2-7 (**Figura 46**). A quantidade de 528 reativa com a banda inferior de EGFR de2-7 aumentou com o tempo, alcançando um pico aos 60 min e decaiu lentamente às 2 e 4 h. Não foi detetada uma quantidade significativa da banda superior marcada de EGFR de2-7 até aos 60 min, após o que o nível continuou a aumentar até ao final do curso de tempo. Isto indica claramente que o EGFR de2-7 superior é uma forma mais madura do recetor. A reatividade do mAb 806 também variou durante o estudo temporal, no entanto o mAb 806 precipitou preferencialmente a banda inferior do EGFR de2-7. De facto, não houve níveis significativos de banda superior de mAb 806 observados até às 4 h após a marcação.

As experiências acima sugerem que o mAb 806 reage preferencialmente com uma forma de glicosilação mais imatura do EGFR de2-7 e wt. Esta possibilidade foi testada através da imunoprecipitação do EGFR a partir de diferentes linhas celulares marcadas de um dia para o outro com ³⁵S-metionina/cisteína e sujeitando depois os precipitados resultantes a digestão com Endoglicosidase H (EndoH). Esta enzima remove preferencialmente hidratos de carbono ricos em manose (i.e. glicosilação imatura) das proteínas deixando ao mesmo tempo os hidratos de carbono complexos (i.e. glicosilação madura) intactos. A imunoprecipitação e digestão com EndoH de lisados de células U87MG. 2-7 marcados com 528, mAb 806 e SC-03 deu resultados semelhantes (**Figura 47**). Tal como previsto, a banda inferior de EGFR de2-7 foi inteiramente sensível à digestão com EndoH, migrando mais depressa em SDS-PAGE após digestão com EndoH, demonstrando que esta banda representa a forma rica em manose do EGFR de2-7. A banda superior de EGFR de2-7 foi essencialmente resistente à digestão com EndoH, mostrando apenas uma diferença muito leve na migração após digestão com EndoH, indicando que a maioria das estruturas de hidratos de carbono são do tipo complexo. A pequena mas reproduzível diminuição no peso molecular da banda superior após digestão com a enzima sugere que enquanto os hidratos de carbono na banda superior de EGFR de2-7 são predominantemente do tipo complexo, possuem algumas estruturas ricas em manose. Interessantemente, estas células expressam também quantidades baixas de EGFR wt endógeno que são claramente visíveis após imunoprecipitação com 528. Houve também uma pequena mas observável redução no peso molecular do

recetor wt após digestão com EndoH, indicando que também contém estruturas ricas em manose.

A sensibilidade do EGFR wt imunoprecipitado a digestão com EndoH foi semelhante tanto em células U87MG.wtEGFR como A431 (**Figura 47**). O grosso do material precipitado pelo anticorpo 528 era resistente à enzima EndoH embora uma pequena quantidade do material estivesse na forma rica em manose. Novamente houve uma pequena diminuição no peso molecular do EGFR wt após digestão com EndoH sugerindo que contém algumas estruturas ricas em manose. Os resultados utilizando o anticorpo SC-03 foram semelhantes aos do anticorpo 528. Em contraste, a maioria do EGFR precipitado pelo mAb 806 era sensível a EndoH tanto em células U87MG.wtEGFR como A431, confirmando que o mAb 806 reconhece preferencialmente a forma rica em manose do EGFR. Resultados semelhantes foram obtidos com células HN-5, em que a maioria do material precipitado pelo mAb 806 era sensível à digestão com EndoH, enquanto a maioria do material precipitado pelo mAb 528 e SC-03 era resistente à digestão com EndoH (dados não mostrados).

A iodação da superfície celular da linha celular A431, foi efetuada com ^{125}I seguido de imunoprecipitação com o anticorpo 806. O protocolo para a iodação da superfície foi como se segue: a lise celular, imunoprecipitação, digestão com EndoH, SDS-PAGE e autorradiografia são tal como descritas acima. Para marcação, as células foram criadas em meio com FCS a 10%, desprendidas com EDTA, lavadas duas vezes com PBS depois ressuspensas em 400 μl de PBS (aprox. $2-3 \times 10^6$ células). A estas foram adicionados 15 μl de ^{125}I (reserva de 100 mCi/ml), 100 μl de lactoperoxidase bovina (reserva de 1 mg/ml), 10 μl de H_2O_2 (reserva a 0,1%) e estas foram incubadas durante 5 min. Foram então adicionados mais 10 μl de H_2O_2 e a incubação continuou durante mais 3 min. As células foram então lavadas novamente 3 vezes com PBS e lisadas em Triton a 1%. A iodação da superfície celular da linha celular A431 com lactoperoxidase, seguida de imunoprecipitação com o anticorpo 806, mostrou que, de forma semelhante à dos lisados de células inteiras descritos acima, a forma predominante do EGFR reconhecida por 806 ligado à superfície celular das células A431 era sensível à digestão com EndoH (**Figura 48**). Isto confirma que a forma de EGFR ligada ao 806 na superfície

celular de células A431 é uma forma sensível a EndoH e é assim o tipo rico em manose.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Ludwig Institute for Cancer Research Ltd.
<120> Proteínas de Ligação Específica e suas Utilizações
<130> P36021EP-D1-PCT

<140> EP09173520.9
<141> 2002-05-13

<150> US 60/290,410
<151> 2001-05-11

<150> US 60/326,019
<151> 2001-09-28

<150> US 60/342,258
<151> 2001-12-21

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 402
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 1
atgagagtgc tgattcittt gtggctgttc acagcccttc ctgggtgtct gtctgtatgtc 60
cagcttcagg agtcgggaccc tagcctgggtg aaaccttctc agtctctgtc ccteacccgc 120
actgtcactgg gtttactcaat caccagtgtat ttgcctggaa actggatccg gcatgttccca 180
ggaaaacaaggc tggagtgat gggctacata agttatagtg gtaacaczag gtacaacccca 240
tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatccca agaaccatattt cttectgcag 300
ttgaattctg tgactatttgaa ggacacagcc acatattact gtgttaacggc gggacgcggg 360
tttccttattt gggccaaagg gactctggtc actgtctctg ca 402

<210> 2
<211> 134
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
1 5 10 15
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
20 25 30
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45
Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr	Cys	Val	Thr	Ala	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
115								120				125			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala										
130															

<210> 3

<211> 384

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

```

atgggtgtcca cagctcagtt ccttgcattc ttgtttgtttt ggtttccagg tgcaagatgt 60
gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120
atcaacttgcctt attcaagtcgaa ggacatataac agtaatataag ggtgggttgcgaa 180
gggaaatcat ttaaggggctt gatctatcat ggaacccaact tggacgtatca agttccatca 240
aggttcagtg gcagtggatc tggagccatcattttctca ccatcagcag cctggaatct 300
gaagattttgcagactatataatctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcgggtggaa 360
ggcaccacaaacgc tggaaatcaa acgt 384

```

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

```

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
20 25 30
Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
35 40 45
Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
50 55 60
Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala
100 105 110
Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

```

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<223> biotinilada na posição 1

<400> 5

```

Asx Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

```

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sintética

<223> biotinilada na posição 13

<400> 6

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Asx
1 5 10

<210> 7

<211> 6149

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> vetor sintético

<400> 7

ctcgagagcg	ggcagtgago	gcaacgcaat	taatgtgagt	tagctcact	attaaqqcacc	60
ccaggetta	cactttatgc	tcccggtcgt	tatgttgtgt	ggagattgtg	agcggataac	120
aalttccacac	agaattcggt	aggctccgg	gcccgtcagt	ggcagagcg	cacatcgccc	180
acatgtcccc	agaqgtggg	gggaggggte	gcaattgaa	ccgggtccta	gagaagggtog	240
cgggggtaa	actggggaa	tgtatgtgt	tactgtcctc	gccttttcc	cgayyylygg	300
ggagaacgt	atataagtq	aqtagtcgc	gtgaacgttc	tttttgcgaa	cgggttgc	360
gccaacac	aggttaagtgc	cgtgtgtgt	tcccggtc	ctggcttctt	tacgggttat	420
gccccgtgc	tgcccttgaat	tacttcacg	ccccgtgt	cagtacgtga	ttcttgcattc	480
cgagotcgg	gttggaaagt	ggtggggag	ttcgaggcc	tgcgttaa	gagcccccttc	540
gcctcggtc	tgagttgagg	cctggcttg	gycylgggc	cgccgctgtc	gaatctgttgc	600
gcacactcgc	gcctgttctc	ctgttctga	taagtctata	gcatttaaa	atttttgtat	660
actctgcgc	acgtcttttt	tctggcaaga	tagtcttgc	aatgcggggc	aagatctgc	720
cactggatt	tcgggttttg	ggccgggggg	cgccgtcggt	cccagcgc	780	
atgttggcg	ggccggggcc	tccgagccgg	gcacccgaga	atccgaoggg	qgtatctca	840
agctggccgg	cctgtctgg	tgcctggcc	cgccggccgg	tgtatgtccc	cgccctggcc	900
ggcaaggctg	gccccgtcg	caccagtgc	gtgagcgaa	agatggccgc	ttcccgcc	960
tgctgcaggg	agctaaaaat	ggaggacgcg	gctgtcgaa	gagccggccg	gtgagtcacc	1020
cacacaaagg	aaaaggccct	ttccgtctc	agccgtcgct	tcatgtgact	ccacggagta	1080
ccggggcgcc	tccaggcacc	tcgatgttgc	ctcgagcttt	tggagtacgt	cgtctttag	1140
tggggggag	gggttttatgc	ccatgggtt	tcccccaact	gaatgggtgg	agactgaact	1200
tagccacgt	tggacttgc	tgtatatttc	cttggatatt	gcccccttttgc	atgttggatc	1260
tgggttccat	ccaaaggctc	agacgtgtt	tcaaagtttt	tttccat	ttcaagggtta	1320
cgcgtctcg	gaaggcttag	ttttaaaggcc	gcacccatgg	tgcacccagc	tcagtcct	1380
gcattttgt	tgctttgggt	tccaggtgca	agatgtgaca	tcctgtatgc	ccaaatctcca	1440
tcctccatgt	ctgtatctct	gggagacaca	gtcagcatca	cttgcattc	aagtcaaggac	1500
attaacagta	atatagggtg	gttgcagcag	agaccaggga	aatcatttaa	ggccctgtatc	1560
tatcatggaa	ccaaacttgg	cgtatggaa	ccatcaagg	tcagtggcag	tggatctgga	1620
gcgcatttatt	ctctcacccat	cagcagctgt	gaatcttgc	atittgcaga	cttatactgt	1680
gtacagcatg	ctcgtttcc	gtggacgttc	ggtggaggcc	ccaaatgttgc	aatcaaacgg	1740
gtgagtggat	ccatctgggg	taagcatgt	gttttctgtc	tgccttatac	atgcctgttg	1800
attatgcgc	aaacaacacac	ccaaaggccag	aactttgttgc	ctttaaacacc	atccctgttt	1860
cttcttccat	caggaactgt	ggctgcacca	tctgttctca	tcttccggcc	atctgtatgag	1920
cagttgaaat	ctggaaactgc	ctctgttgc	tgcctgtgt	ataacttata	tcccagagag	1980
gccaaaggatc	agtggaaagg	ggataacgc	cttcaatcg	gtactccca	ggagagtgtc	2040
acagagcagg	acagcaagg	cagcacatc	agcttcgc	gcacccgtac	gctgacaa	2100
gcgactactc	agaacacacac	agtctacgc	tgcgttgtca	cccatcagg	cctgtgtctc	2160
ccctgcacaa	agatgttcaaa	ggggggag	tgttgatgtca	gaactaacta	actaactgt	2220
caacgttttc	cctctagcg	gatcaatttgc	ggccccccccc	cttacacgtt	ctggccgaag	2280
cccttggaa	taaqcccggt	gtgcgttttgc	ctatgttta	tttccacca	tattqcccttc	2340

ttttggcaat gtagggccc gaaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttccttagggg 2400
 tccttcctt ctgcacaaag gaatcaagg tctgttgaat gtctgtgg aagcagttcc 2460
 tctggaaatct tcttgaagac aaacaacgtc tctgtggacc ctttgcggc agcggaaacc 2520
 cccacctggc gacaggtgcc tctgtggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa 2580
 ggcggcacaa ccccaagtgc acgttggag ttgtatgtt gtggaaagag tcaaattggc 2640
 ctcttcacaaat gtattcaaca aagggtgtaa ggatgtccca aaggttacccc attgtatggg 2700
 atctgtatcg gggcctcggtt gcatatgtt tctgtgtt tagttaggtt aaaaaacgt 2760
 cttagggcccc cgaaccacgg gtaggtgtt ttcccttggaa aacacgata ataccatgg 2820
 tgaacaagat ggattgcacg cagggttctcc gggccgttgg gtggagggc tattcggc 2880
 tgaactggca caacagacaa tcggctgtc tcatgtccgc gtgttccggc tgcagcgca 2940
 gggggccccc gtttctttt tcaagaccca cctgtccggc gcctgtatgt aactgcggg 3000
 cgaggccacgg cggctatcggt ggcgtggccac gacgggggtt cttgtccggc ctgtgtcc 3060
 ctgtgtactt gaaaggggaa gggactgggt gctattggc gatgtccgg ggcaggatct 3120
 cctgtcatct caccctgtc tctgtccggaa atgtatccatc atggctgtatc caatgcggc 3180
 gctgcatacg cttgtccggc ctaccgtcc accgtggatc tgcgtatc gatgtatgg acgaagagca 3240
 gctgagcactg acgtggatgg aagccggct tgcgtatc gatgtatgg acgaagagca 3300
 tcaaggggctc ggcgtggccac auctgttgc cagggtccatc ggcgtatc ggcgtggcc 3360
 ggtatctgtc gtgtccatgt ggcgtatgtt cttgtatgttgg aaaaatggcc 3420
 cttttcttggat ttcatcgact gtggccggc ggggttggcg gacgttatac aggacatagc 3480
 gtgtgttaccat cgtatgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3540
 gctttttttt atcgccgtc cccatgtcc ggcgtatcgc ttctatgc ttctgtatc 3600
 gttttttttt gtcgtatc gtcgtatc gtcgtatc gtcgtatc gtcgtatc 3660
 caacatgttc gcaatgttca tggcaatgg gacggccctt gtacggccgc attaagcg 3720
 ggggggttgggg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3780
 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3840
 aatcgccgtc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3900
 ctgtttttttt gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3960
 tgacgttggg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4020
 accctatctc ggttcttatttta taagggtttt tttttttttt tttttttttt 4080
 agtcttttttta aaaaaattttta acgtggatatttta taacatgttta caatgtttagt 4140
 ggcactttttt gggggatatttta acgtggggatccctttttt tttttttttt 4200
 caaatatgttta tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4260
 gggaggttat gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4320
 gccttactgt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4380
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4440
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4500
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4560
 atgactttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4620
 gagaattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4680
 caacgtatggg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4740
 ctggccttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4800
 ccacgtatggg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4860
 cttagcttc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4920
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 4980
 gtgggttctgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5040
 ttatcttacatc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5100
 taggtgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5160
 agattgtttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5220
 atctcatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5280
 aaaaatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5340
 caaaaaatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5400
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5460
 gtgtgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5520
 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5580
 acgtatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5640
 caqcttggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5700
 cggccatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5760
 agggaggtttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5820
 gtgtgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5880
 atggaaaaatccat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 5940
 tcacatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6000

gtgtgttgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6060
 agcggaaatccat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6120
 caggtatgttca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6149

<210> 8
 <211> 6625
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> vetor sintético

<400> 8

<210> 9
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> vetor sintético
 <400> 9
 Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Trp Phe Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
 50 55 60
 Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
 65 70 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 95
 Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala
 100 105 110
 Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 10
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> vetor sintético
 <400> 10
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Tyr Ser Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 11

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

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 12

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

Lisboa, 2015-11-04

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo, em que o referido anticorpo isolado ou o seu fragmento ativo:

- (a) se ligam a EGFR humano de tipo selvagem ligado às células quando o gene de EGFR está amplificado;
- (b) se ligam a EGFR de 2-7 num epítopo distinto do péptido de junção LEEKKGNVVTDH;
- (c) não se ligam a células de tipo selvagem que expressam EGFR endógeno;
- (d) reconhecem um epítopo dentro da sequência de resíduos 273-501 do EGFR humano de tipo selvagem.

2. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo, de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo isolado ou o seu fragmento ativo compreendem:

- (i) uma região VH possuindo pelo menos 70% de identidade com uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:11 e/ou uma região VL possuindo pelo menos 70% de identidade com uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:12;
- (ii) uma região VH possuindo pelo menos 70% de identidade com uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:2 e/ou uma região VL possuindo pelo menos 70% de identidade com uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:4;
- (iii) uma sequência de cadeia pesada possuindo pelo menos 70% de identidade com uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:10 e/ou uma sequência de cadeia leve possuindo pelo menos 70% de identidade com uma sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9; ou
- (iv) uma sequência de cadeia pesada possuindo pelo menos 70% de identidade com a forma madura da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:10 e/ou uma sequência de cadeia leve possuindo pelo menos 70% de identidade com a forma madura da sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO:9.

3. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o referido anticorpo

isolado ou seu fragmento ativo é humanizado ou tornado quimérico.

4. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-3, em que o referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo compreendem uma estrutura de anticorpo humano.

5. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-4, em que o referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo estão na forma de um anticorpo F(ab')₂, fragmento scFv ou diacorpo.

6. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-5, em que o referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo possuem um marcador detetável ou funcional.

7. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com a reivindicação 6, em que o referido marcador é um fármaco covalentemente ligado ou um radiomarcador.

8. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com a reivindicação 7, em que o referido radiomarcador é um de ¹⁴C, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In ou ⁹⁹Tc.

9. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com a reivindicação 6, em que o referido marcador é um fármaco citotóxico.

10. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-9 para utilização no tratamento ou diagnóstico do corpo humano ou animal.

11. Utilização do anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-9 para o fabrico de um medicamento para o tratamento ou a prevenção de cancro num mamífero.

12. Anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-9 para utilização no tratamento ou prevenção de cancro num mamífero.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 11, ou anticorpo isolado ou seu fragmento ativo para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o referido cancro é um glioma.

14. Utilização de acordo com a reivindicação 11 ou a reivindicação 13, ou anticorpo isolado ou seu fragmento ativo para utilização de acordo com a reivindicação 12 ou a reivindicação 13, em que o referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo é administrado primeiro e posteriormente é administrada uma composição compreendendo um agente quimioterapêutico.

15. Ácido nucleico isolado, compreendendo uma sequência que codifica o anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-9.

16. Método de preparação de um anticorpo isolado ou um seu fragmento ativo, compreendendo a expressão do ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15 sob condições que levem à expressão do referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo, e a recuperação do referido anticorpo isolado ou seu fragmento ativo.

17. Estojo para o diagnóstico de um tumor no qual o EGFR está amplificado ou sobre-expresso ou o EGFR é expresso na forma de uma proteína truncada, compreendendo o anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-9, opcionalmente com reagentes e/ou instruções para utilização.

18. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo isolado ou seu fragmento ativo de acordo com uma das reivindicações 1-9 e, opcionalmente, um veículo, um transportador ou um diluente farmaceuticamente aceitáveis.

19. Célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15.

20. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 19, em que a referida célula hospedeira é selecionada de entre o grupo que consiste em células de *E. coli*, leveduras, CHO, NSO e células de inseto.

Lisboa, 2015-11-04

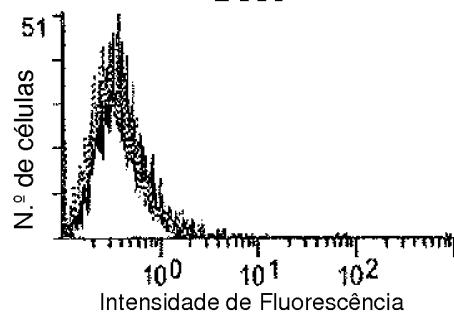
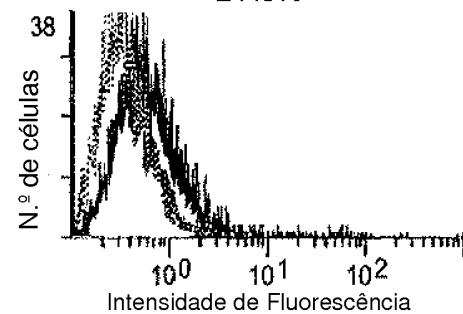
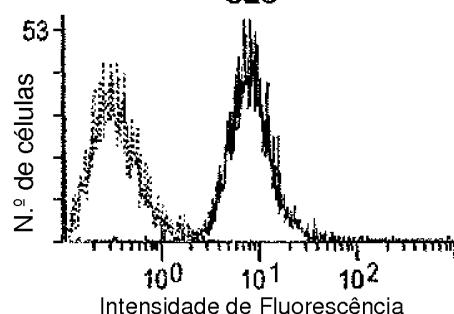
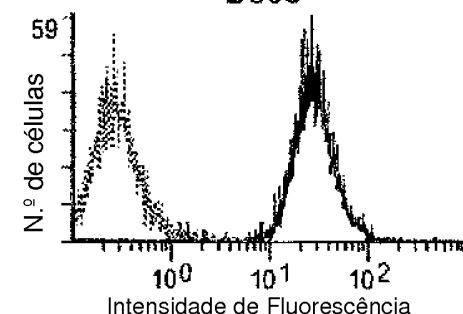
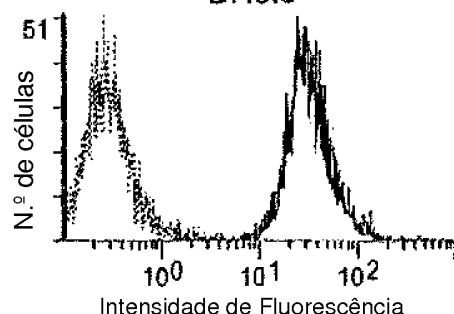
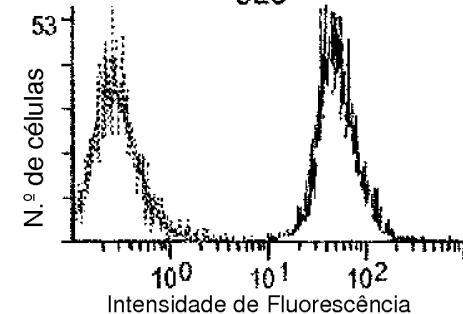
FIG. 1A
D806**FIG. 1B**
DH8.3**FIG. 1C**
528**FIG. 1D**
D806**FIG. 1E**
DH8.3**FIG. 1F**
528

FIG. 2A

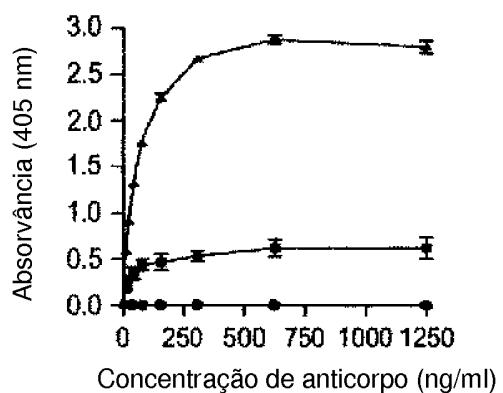


FIG. 2B

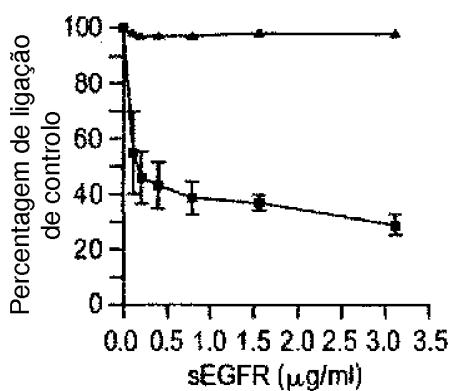


FIG. 2C

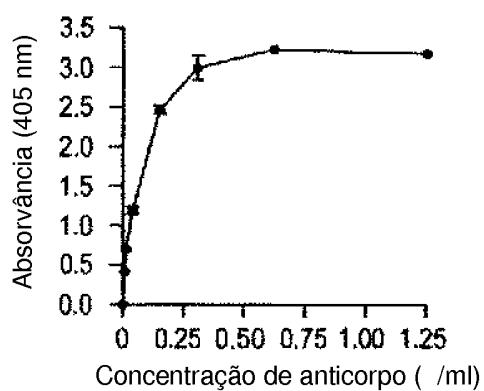


FIG. 2D

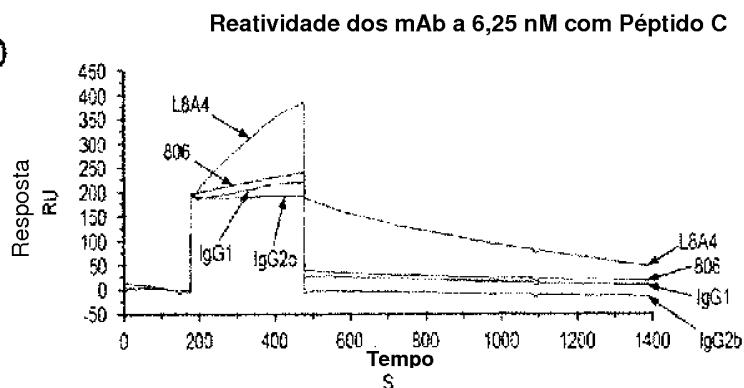


FIG. 2E

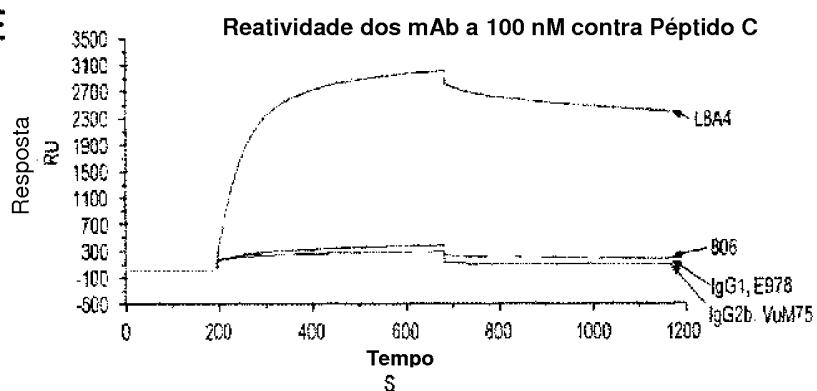


FIG. 3

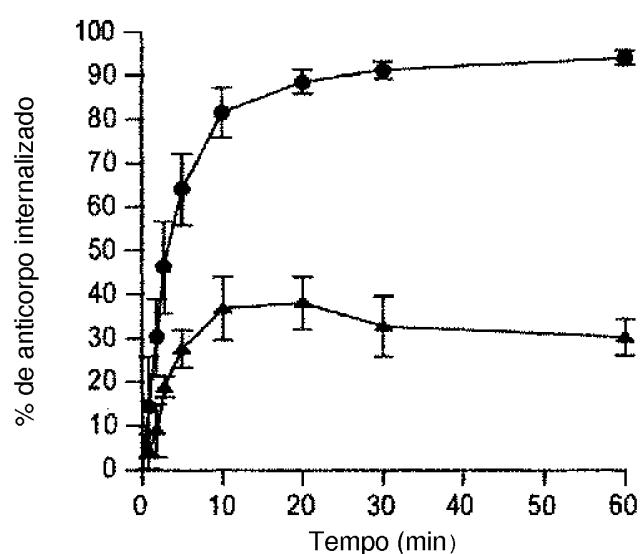


FIG. 4A

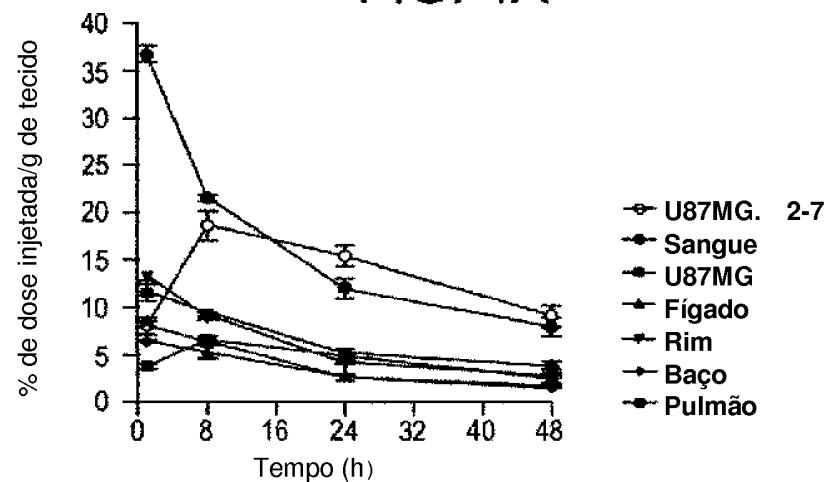


FIG. 4B

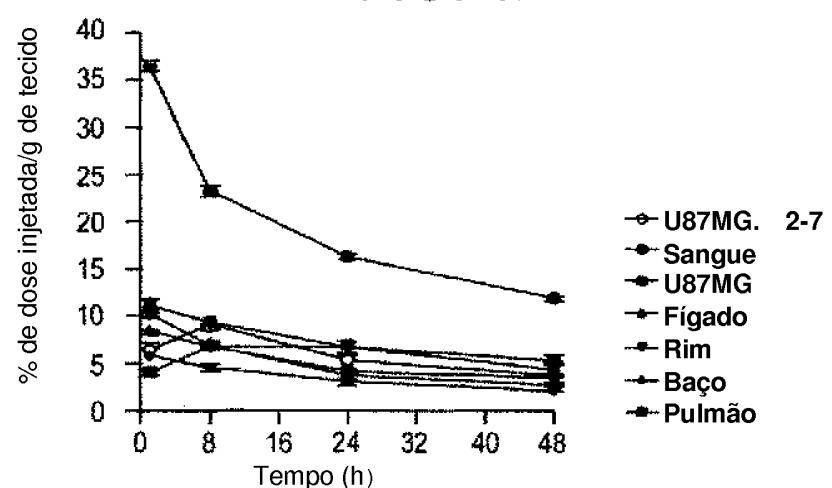


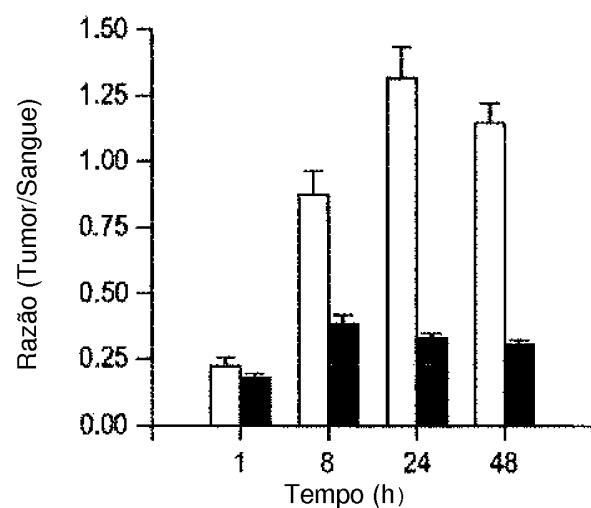
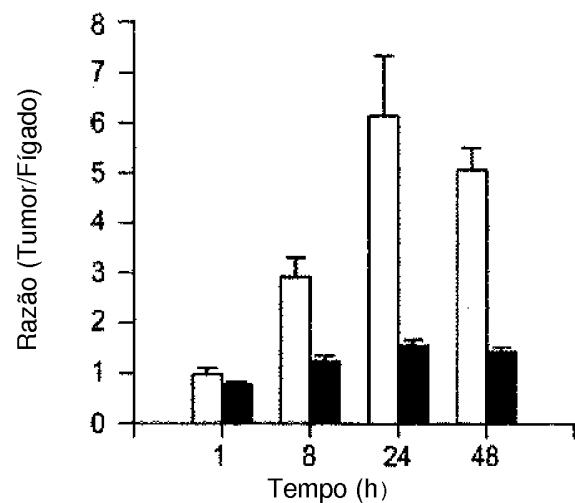
FIG. 5A**FIG. 5B**

FIG. 6A
mAb 806

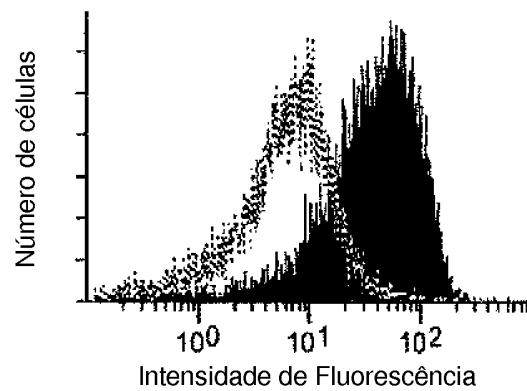


FIG. 6B
DH8.3

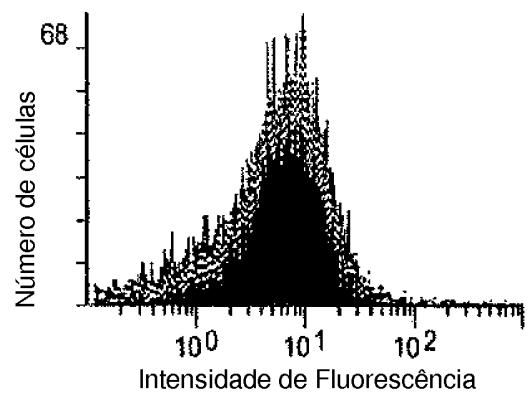


FIG. 6C
528

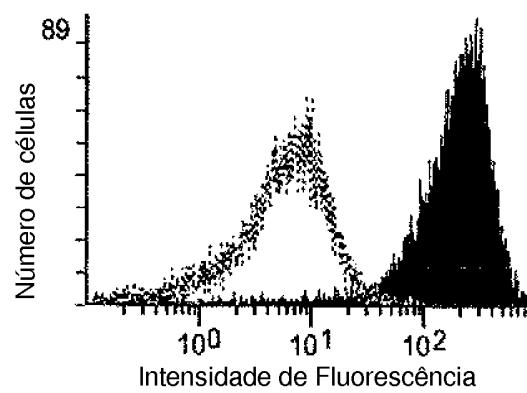


FIG. 7A

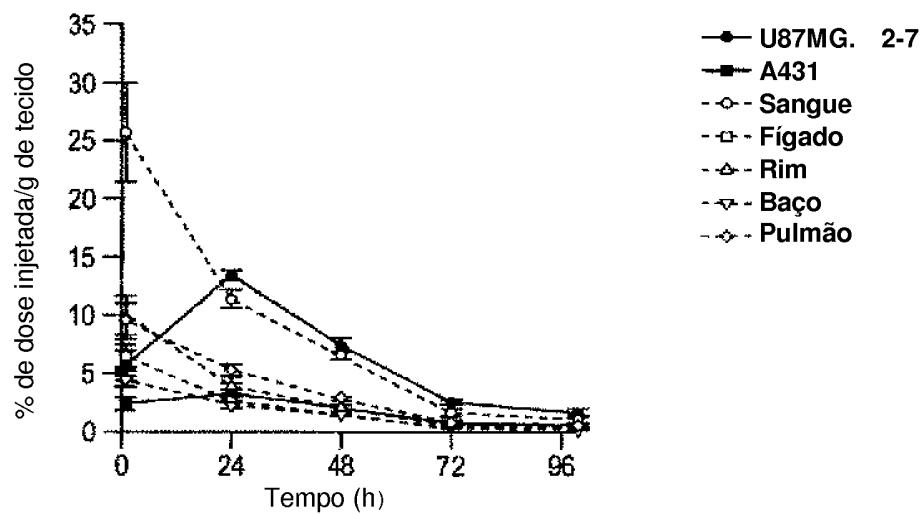


FIG. 7B

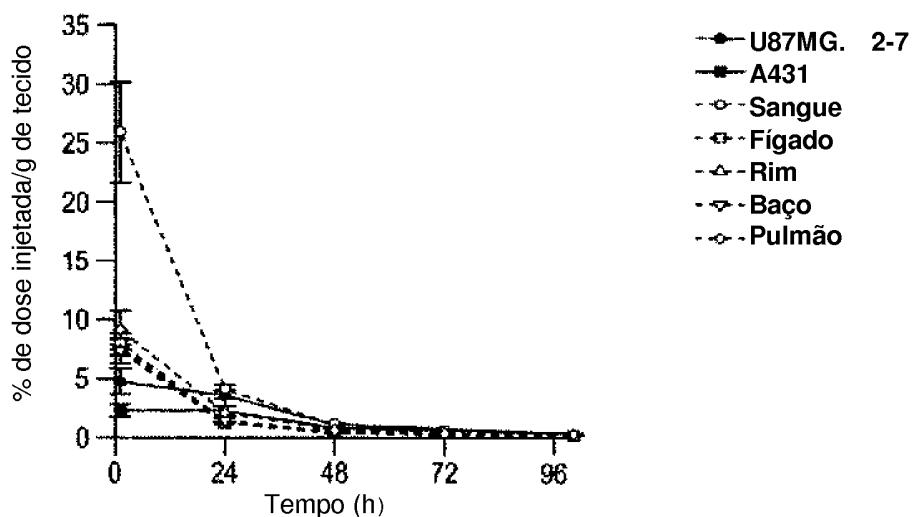


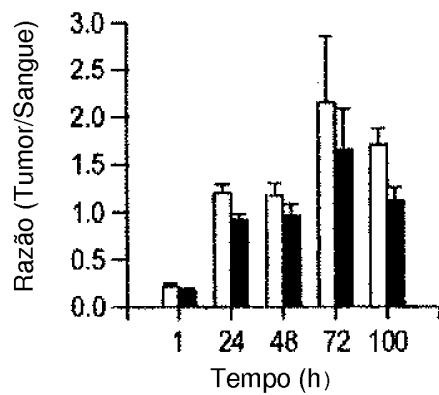
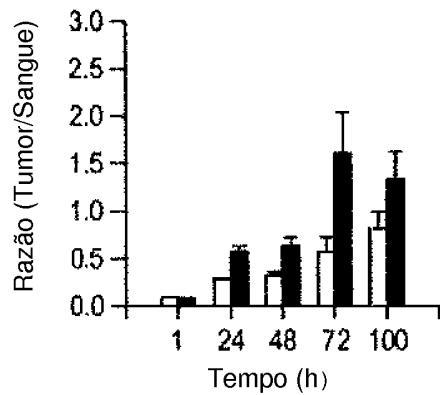
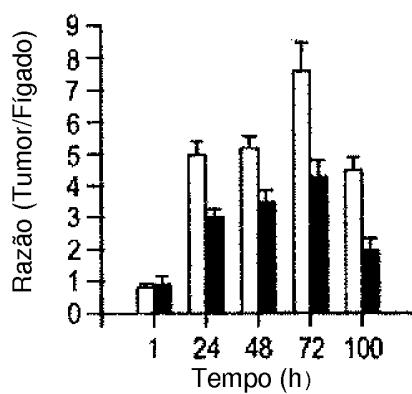
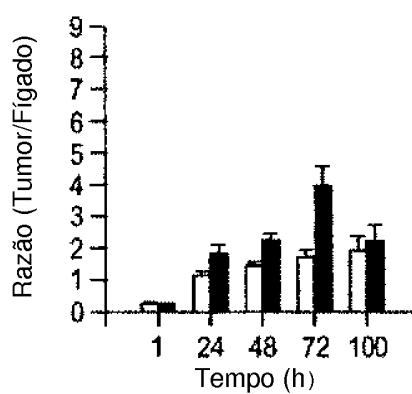
FIG. 8A**FIG. 8B****FIG. 8C****FIG. 8D**

FIG. 9A

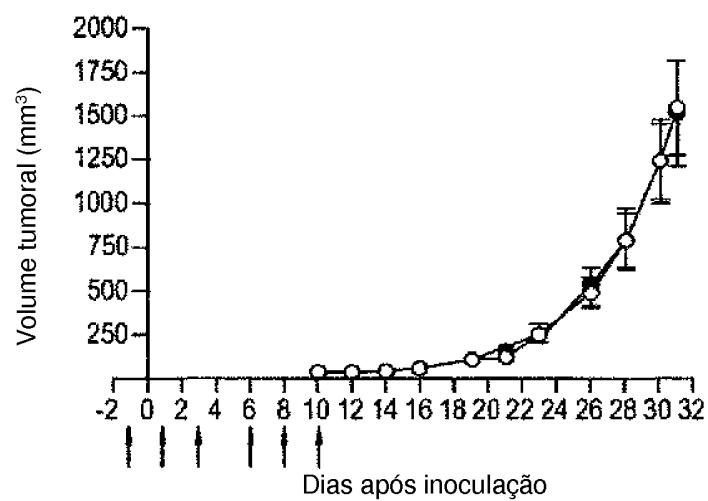


FIG. 9B

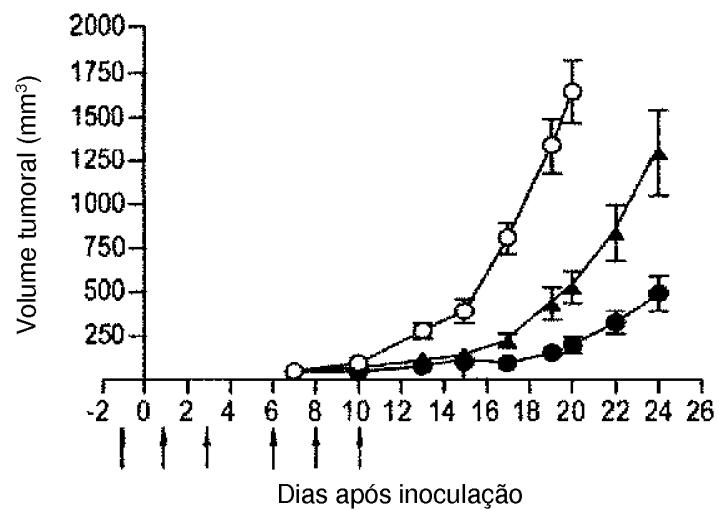


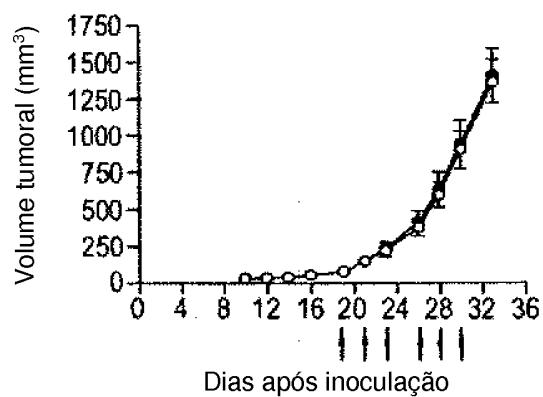
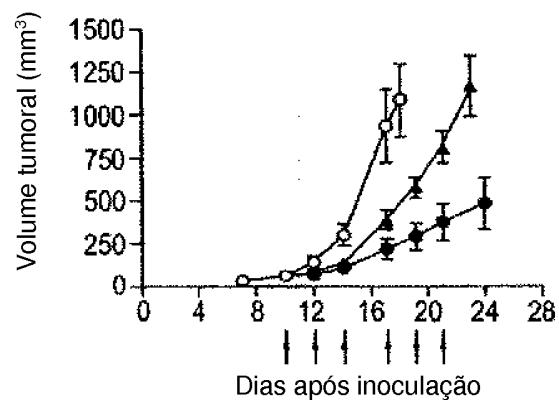
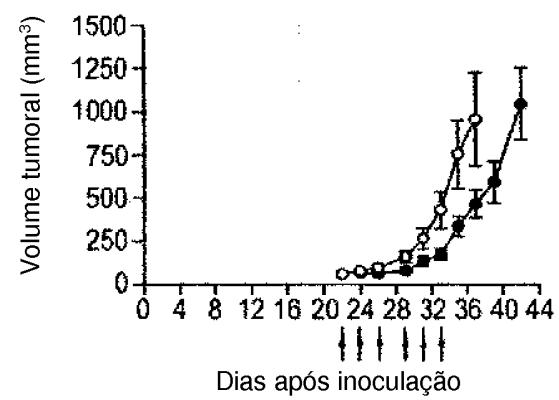
FIG. 10A**FIG. 10B****FIG. 10C**

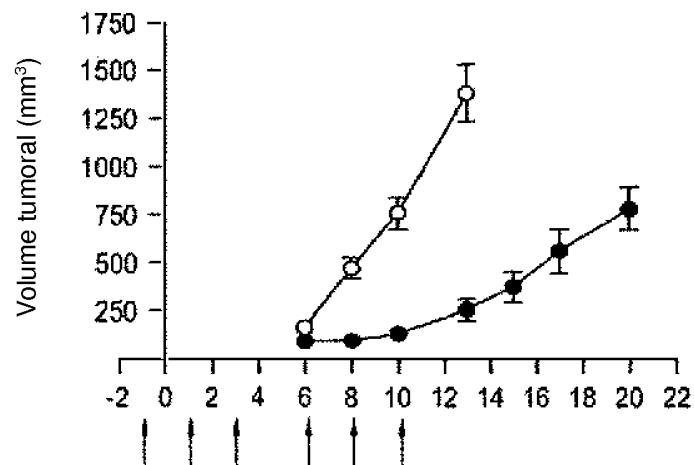
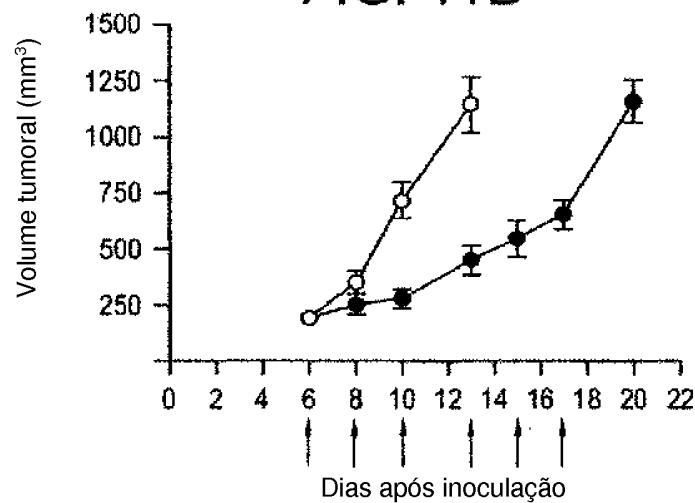
FIG. 11A**FIG. 11B**

FIG. 12

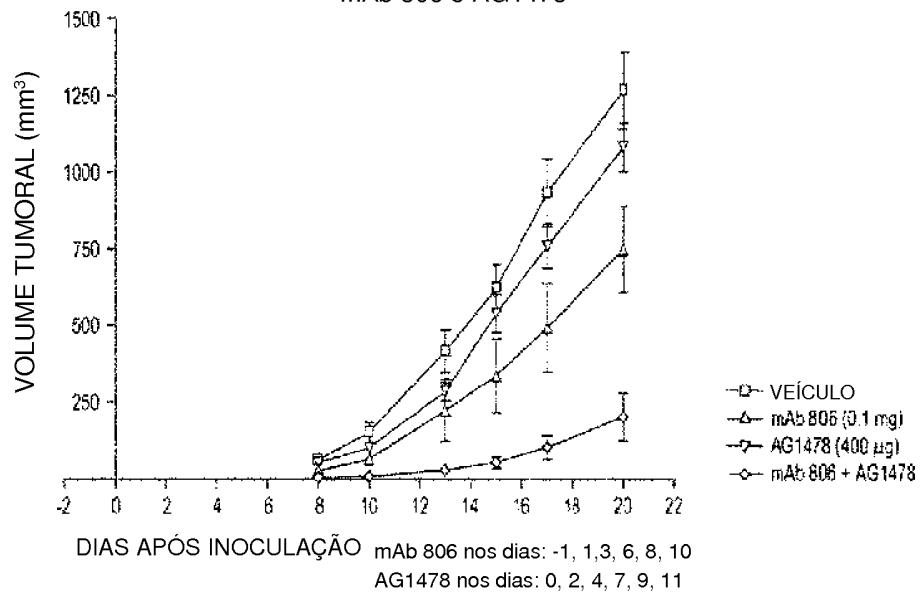
TRATAMENTO DE XENOENXERTOS A431 COM
mAb 806 e AG1478

FIG. 13

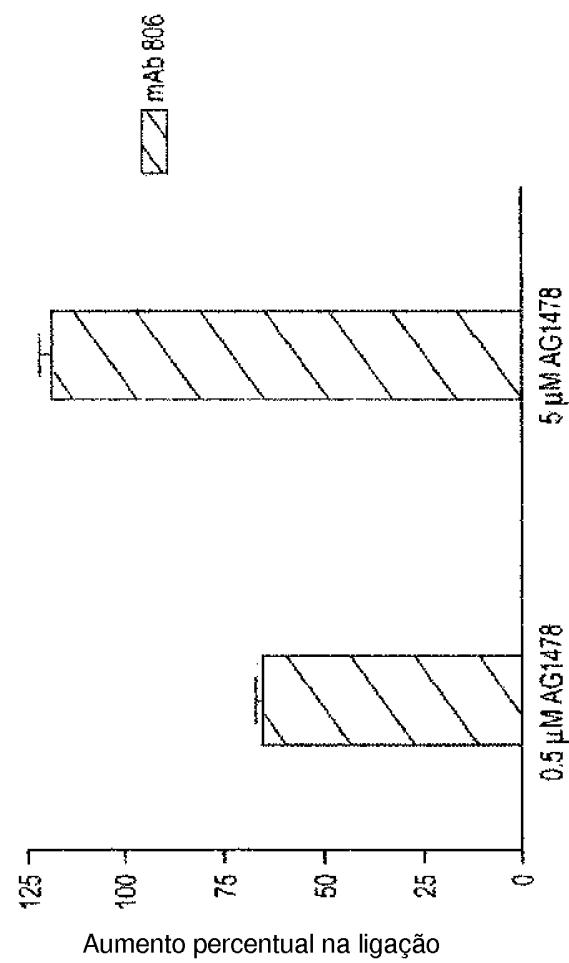


FIG. 14Sequência de ADN e proteica de VH de 806 e do péptido de sinalSequência de ADN

```

ATGAGAGTGCTGATTCTTTCTGGCTGTTCACAGCCTCCTGGTGTCCCTGTCT
GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACACCTTCAGTCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAAGTGATTTGCCTGGA
ACTGGATCCGGCAGTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
TTATAGTGGTAACACTAGGTAACAAACCCATCCTCCAAAAGTCGAATCTCTATCA
CTCGAGACACATCCAAGAACCAATTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATT
GAGGACACAGCCACCATATTACTGTGTAACGGCGGGACGCGGGTTCTTATT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACACTGTCTGTCA

```

A área sublinhada é o péptido de sinal

A restante sequência é a região VH de 806

Sequência proteica



 MRVLILLWIFTAFFPGVLSDVQLQESCPSLVKPSQSLSLTC
 TVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
 PSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG
 FPYWGQGTLVTVSA

FIG. 15Sequência de ADN e proteína de VL de 806 e do péptido de sinalSequência de ADN

```

ATGGTGTCCACAGCTCAGTCCTGCATTCTGTTGCTTGGTTCCAGGTGCA
AGATGTGACATCCTGATGACCCAAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGG
AGACACAGTCAGCATCACTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATA
GGGTGGTTGCAGCAGAGACCAAGGGAAATCATTAAAGGGCTGATCTATCATG
GAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG
AGCCGATTATTCTCACCACAGCAGCCTGGAAATCTGAAGATTTGCAGACT
ATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTCCGTGGACGTTGGTGGAGGCACCAAG
CTGGAAATCAAACGT

```

A área sublinhada é o péptido de sinal

A restante sequência é a região VL de 806

Sequência proteíca


VL
 MVSTAQFLAFLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVS
 1TCHSQQDINSNICWLQQRPCKSFKCLIYHCTNLDDEVPSR
 PSGSGSGADYSLTISSESEDFAADYYCVQYAQFPWTFGGG
 TKLEIKR

FIG. 16

M806	D V Q L Q E S G P S L V K P S Q S L S I F C T V T G Y S I T S D P A N W	H1	36	
			35A	
M806	I R Q F P G N K L E W M G Y I S - Y S G N T R Y N P S L K S R I S I T R D	H2	25	
			24	
M806	T S K N Q F F L Q L N S V T I E D T A T Y Y C V T A G R G F P Y W G Q G T	H3	11	
			10	
M806	L V T V S A		9	
			8	
M806	113		7	
			6	
M806	112		5	
			4	
M806	111		3	
			2	
M806	110		1	
M806	109			
M806	108			
M806	73			
M806	74			
M806	75			
M806	76			
M806	77			
M806	78			
M806	79			
M806	80			
M806	81			
M806	82A			
M806	82B			
M806	82C			
M806	83			
M806	84			
M806	85			
M806	86			
M806	87			
M806	88			
M806	89			
M806	90			
M806	91			
M806	92			
M806	93			
M806	94			
M806	95			
M806	96			
M806	97			
M806	98			
M806	99			
M806	100			
M806	101			
M806	102			
M806	103			
M806	104			
M806	105			
M806	106			
M806	107			

FIG. 17

mAb-806
V_L

806	D I L W T Q S P S S M S V S + G D T V S	L1	74	R	108
			73	S	107
			72	S	106
			71	D Y S	105
			70	R	104
			69	S C S	103
			68	S C S	102
			67	S C S	101
			66	S C S	100
			65	S C S	99
			64	S C S	98
			63	S C S	97
			62	S C S	96
			61	S C S	95
			60	S C S	94
			59	S C S	93
			58	S C S	92
			57	S C S	91
			56	S C S	90
			55	S C S	89
			54	S C S	88
			53	S C S	87
			52	S C S	86
			51	S C S	85
			50	S C S	84
			49	S C S	83
			48	S C S	82
			47	S C S	81
			46	S C S	80
			45	S C S	79
			44	S C S	78
			43	S C S	77
			42	S C S	76
			41	S C S	75
			40	S C S	
			39	S C S	
			38	S C S	
806	L S S L E S S E D F A D Y C V Q Y A Q E P W T F G G G T K L E I K R	L3			

FIG. 18A

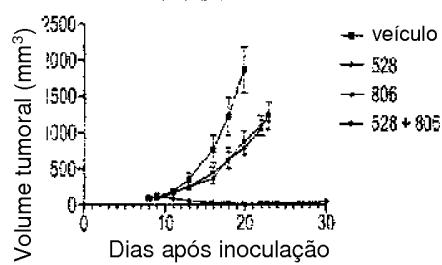


FIG. 18B

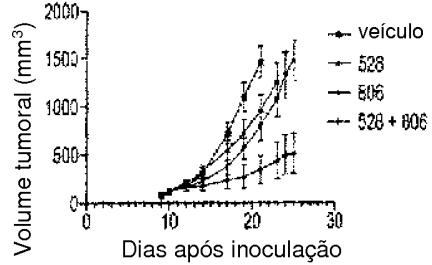


FIG. 18C

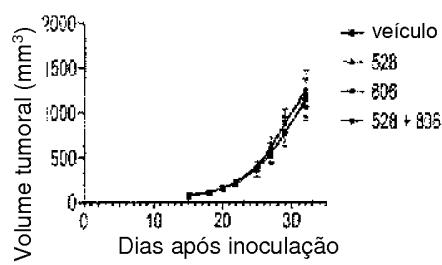


FIG. 18D

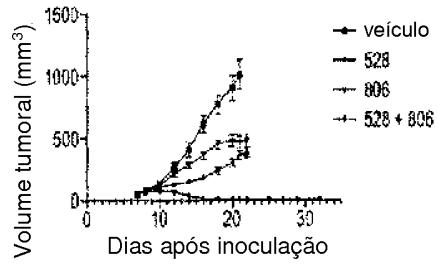


FIG. 19A

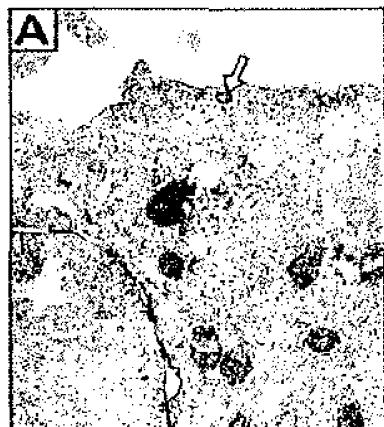


FIG. 19B

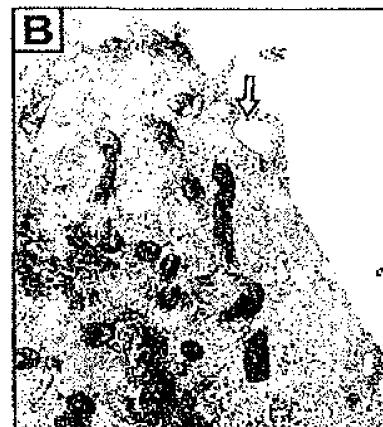


FIG. 19C

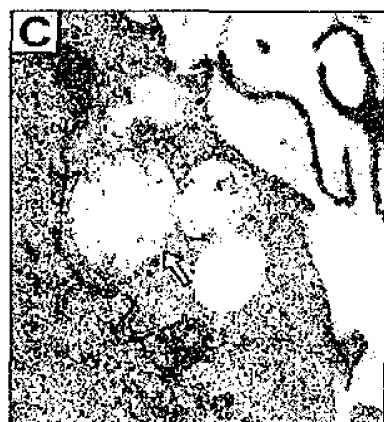


FIG. 19D



FIG. 20

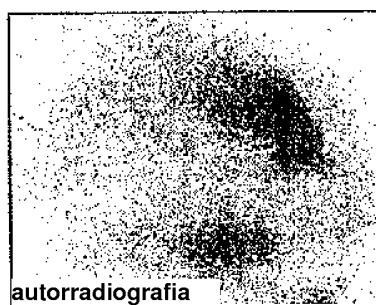
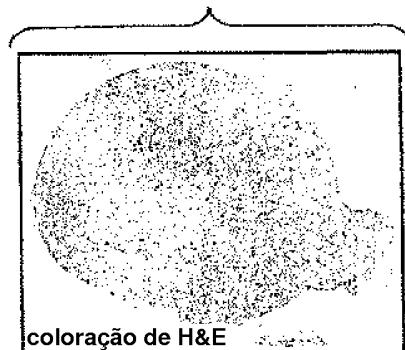


FIG. 21A

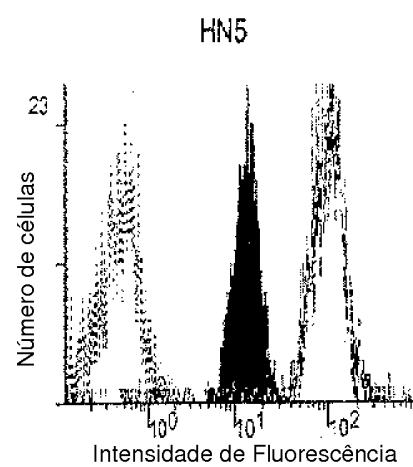


FIG. 21B

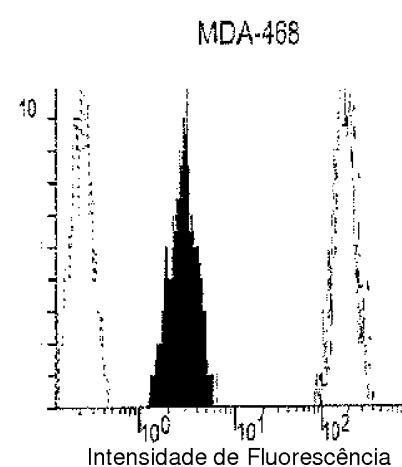


FIG. 22

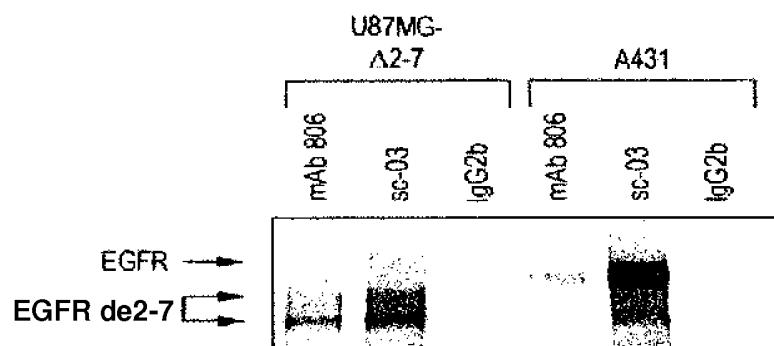
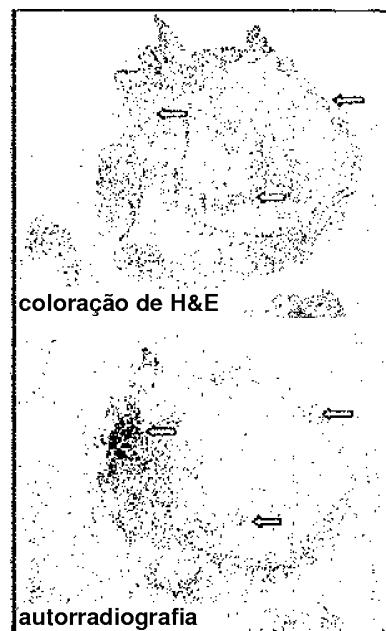


FIG. 23



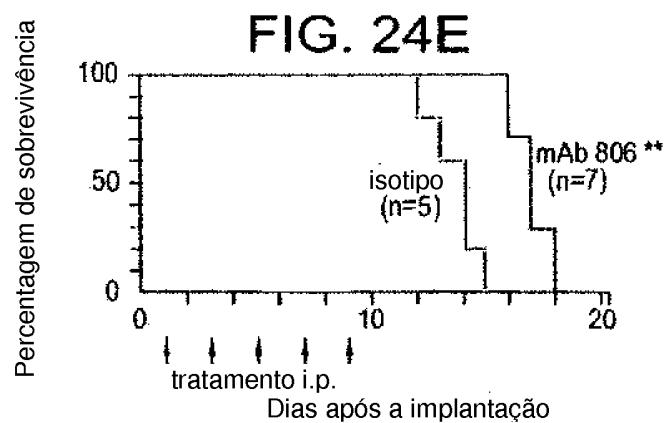
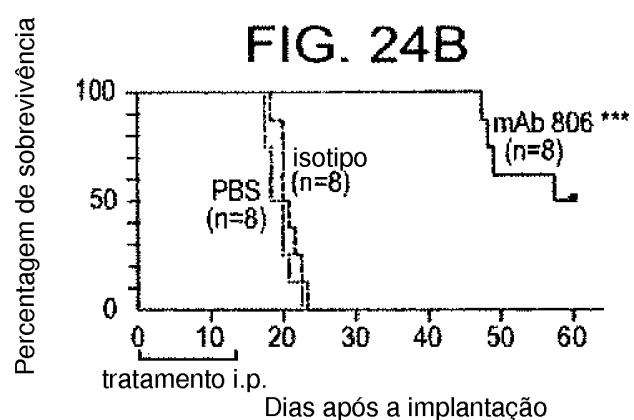
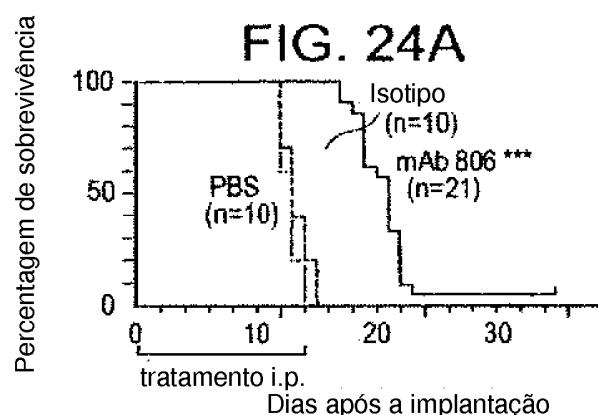


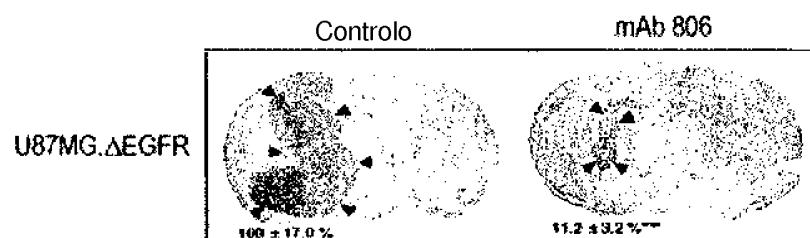
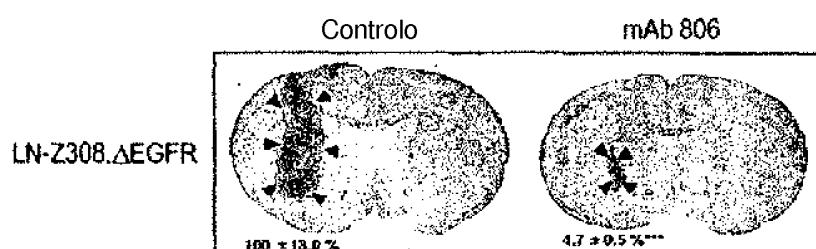
FIG. 24C**FIG. 24D**

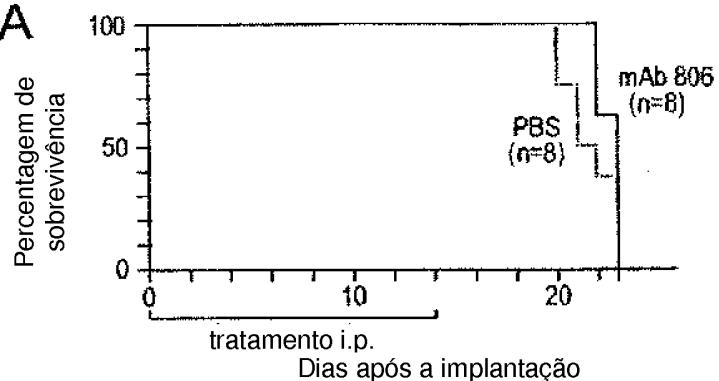
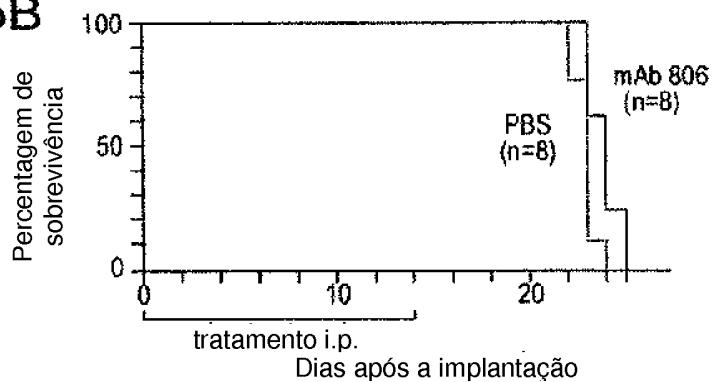
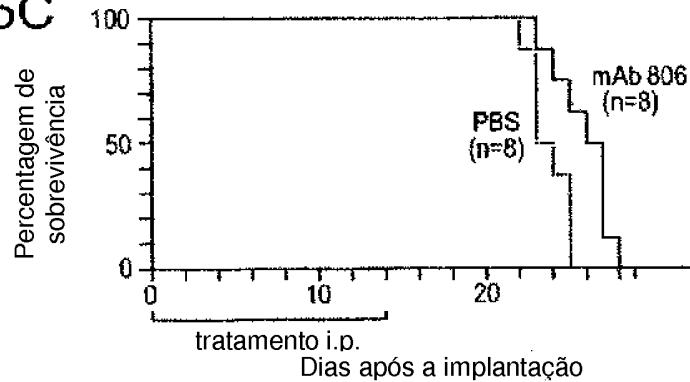
FIG. 25A**FIG. 25B****FIG. 25C**

FIG. 26A

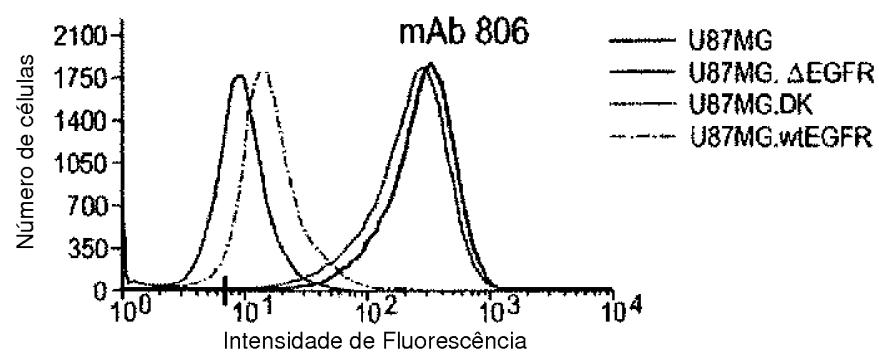
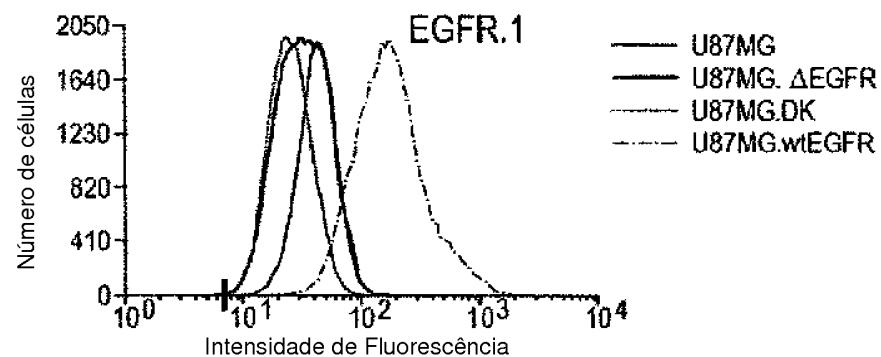
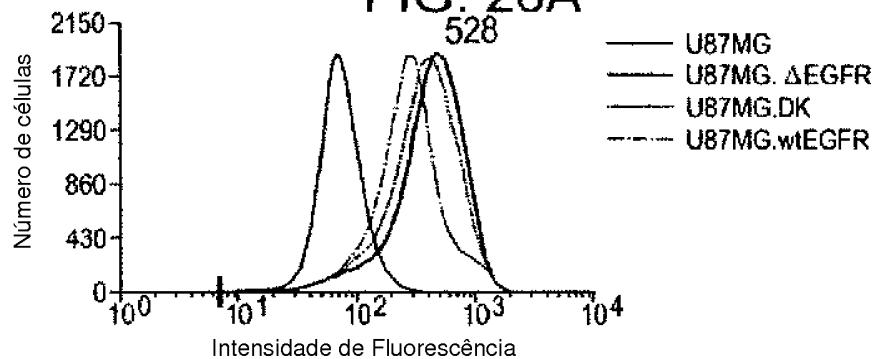


FIG. 26B



FIG. 27

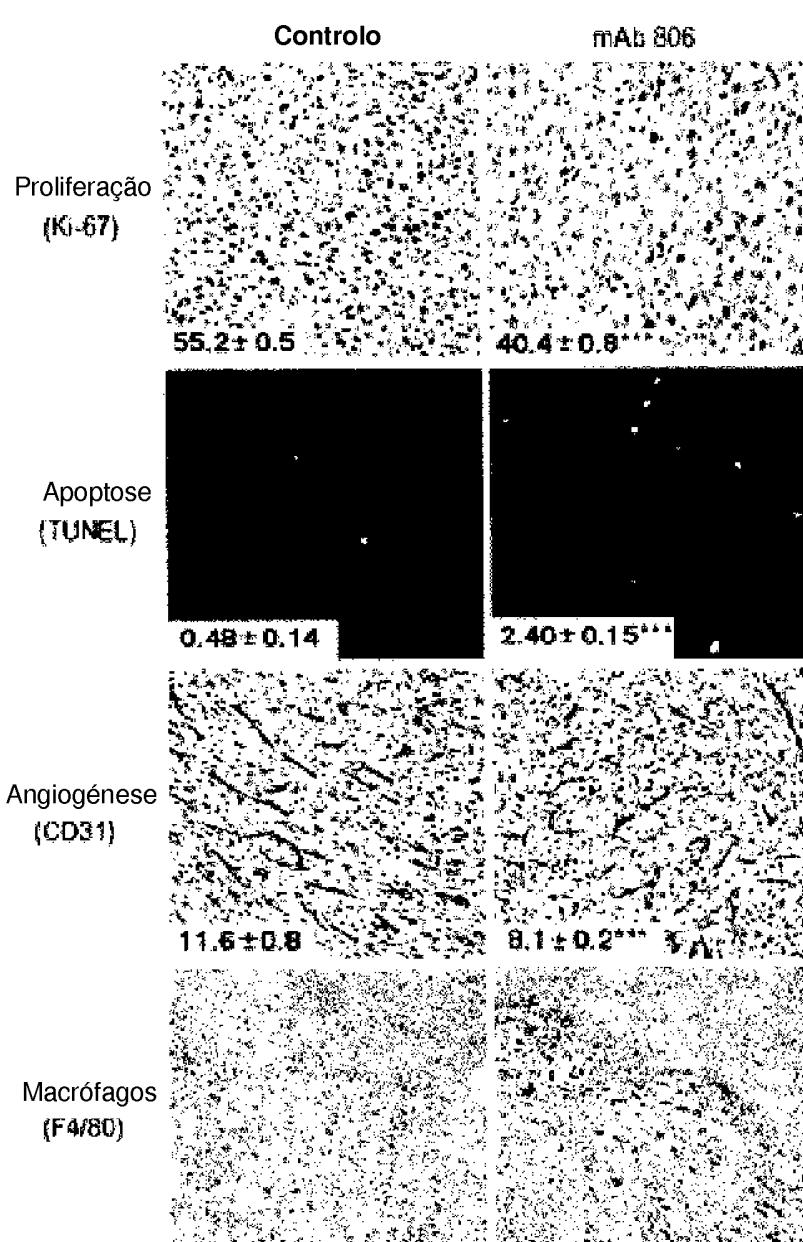


FIG. 28A

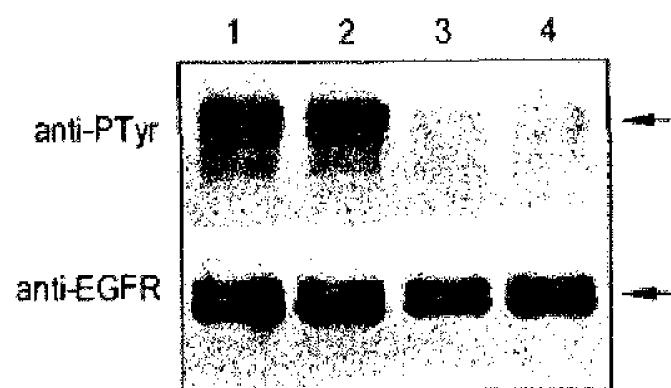
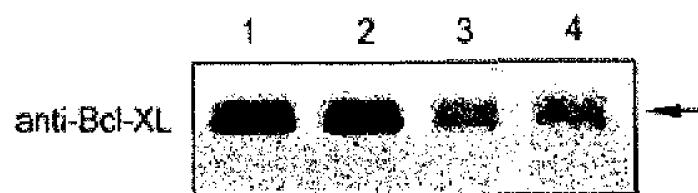
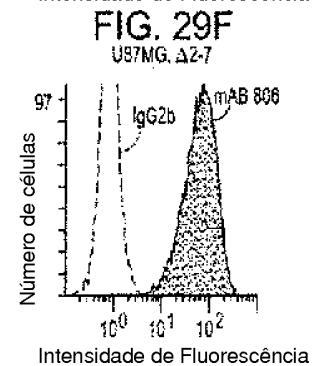
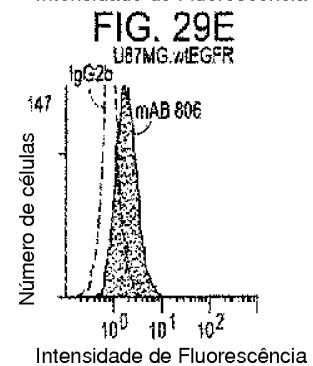
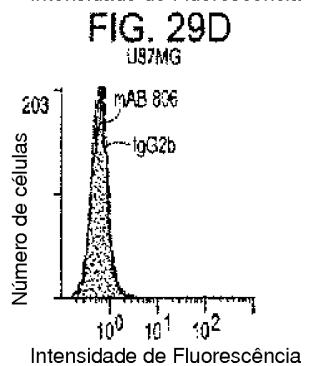
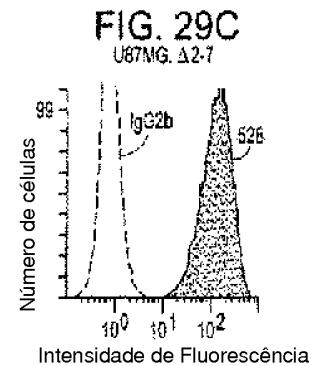
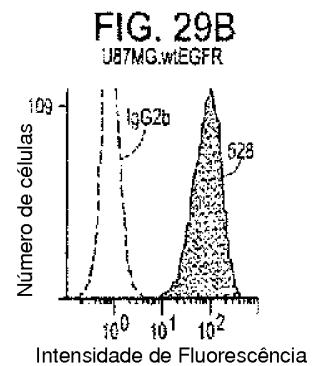
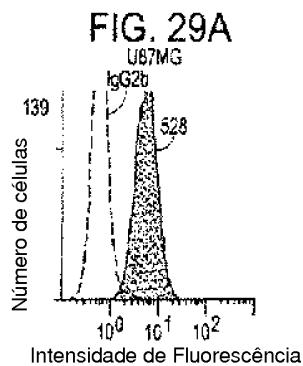


FIG. 28B





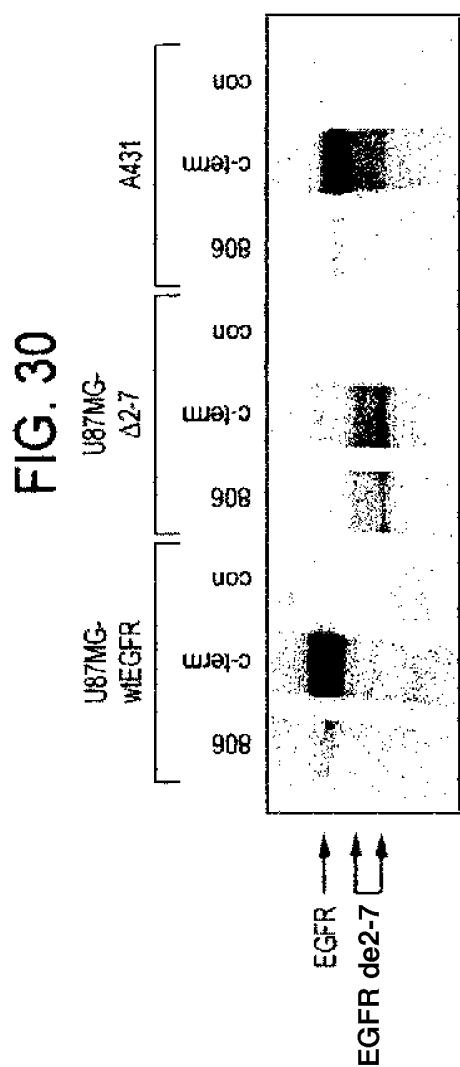


FIG. 31

Tratamento

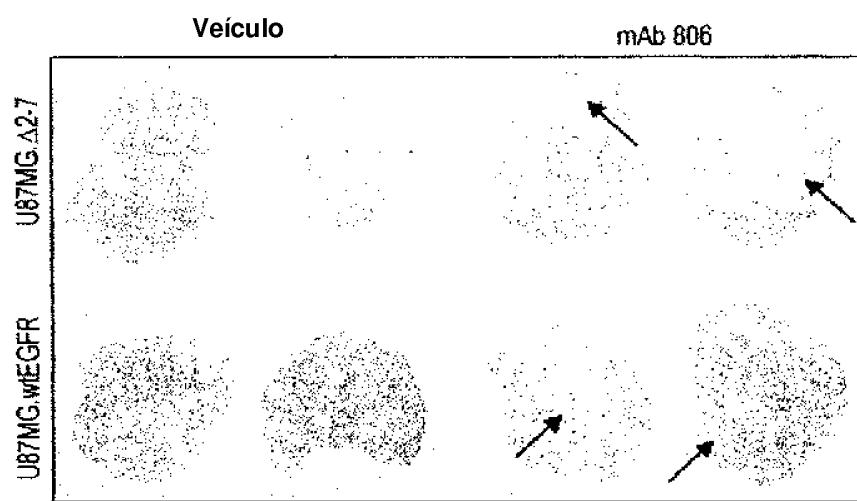


FIG. 32

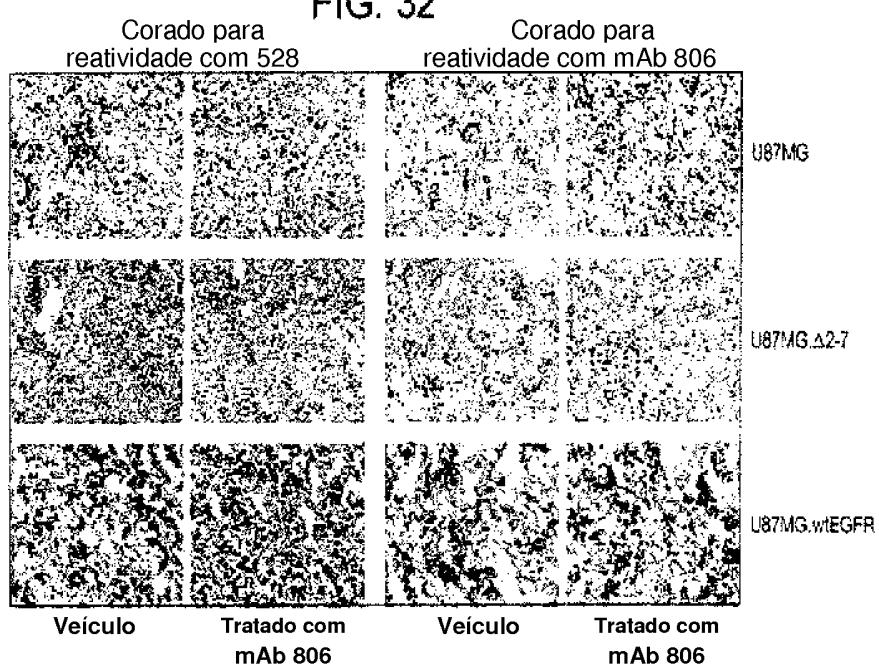


FIG. 33A

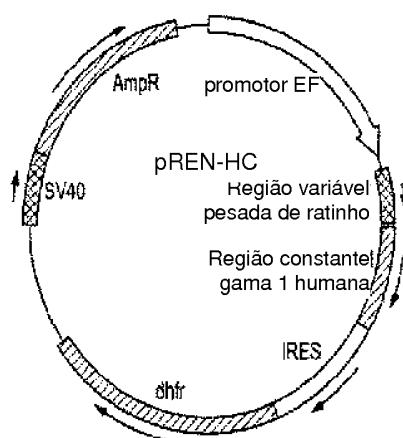


FIG. 33B

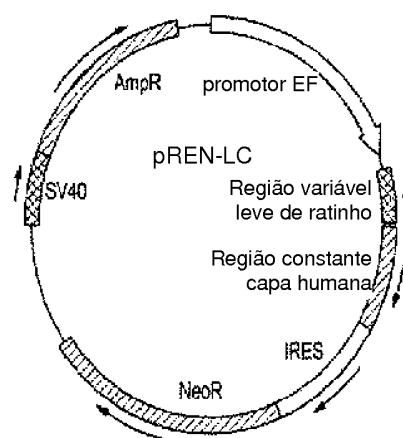


FIG. 34A

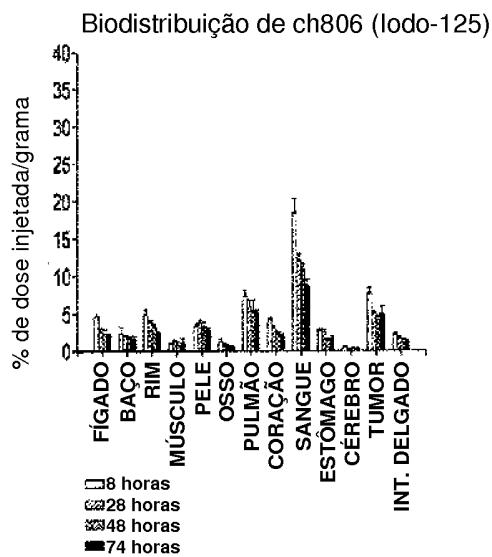


FIG. 34B

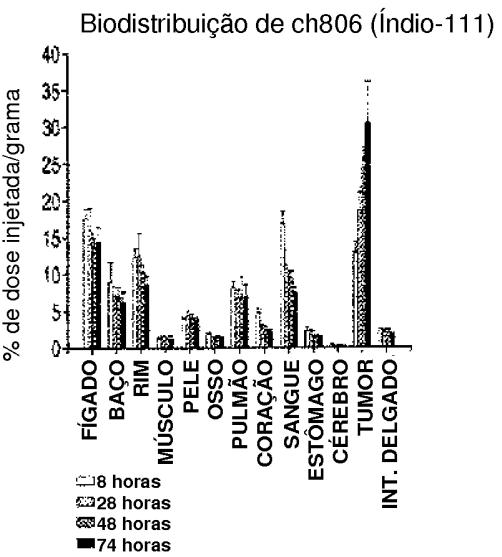


FIG. 35A

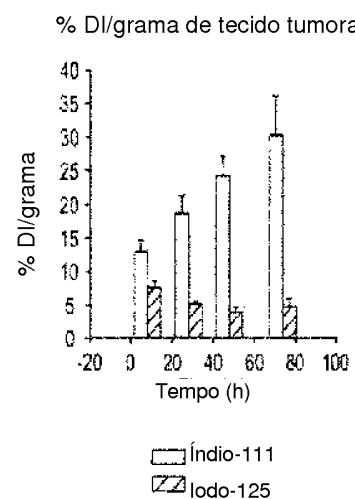


FIG. 35B

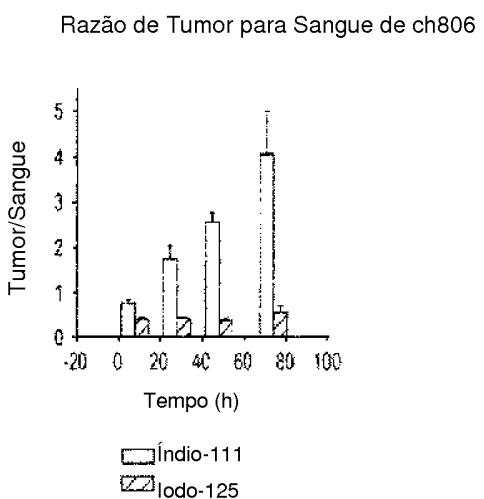


FIG. 36

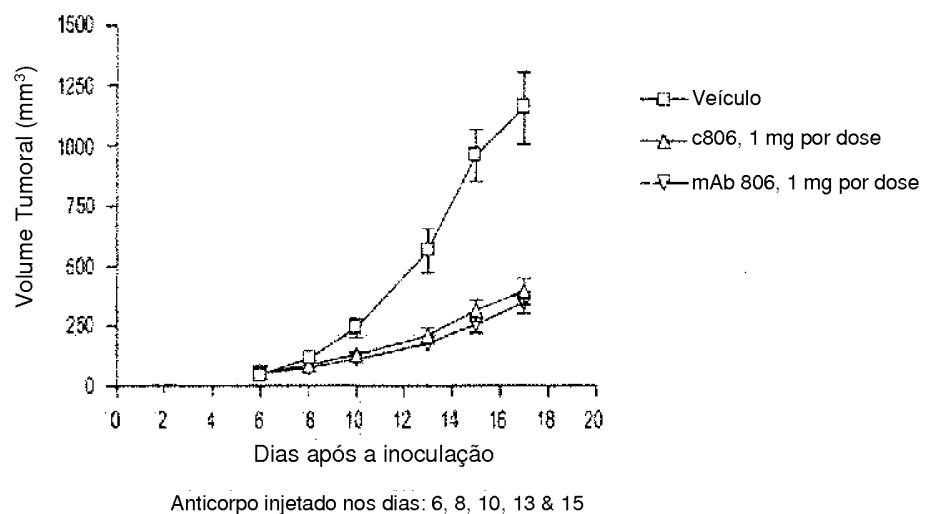


FIG. 37A

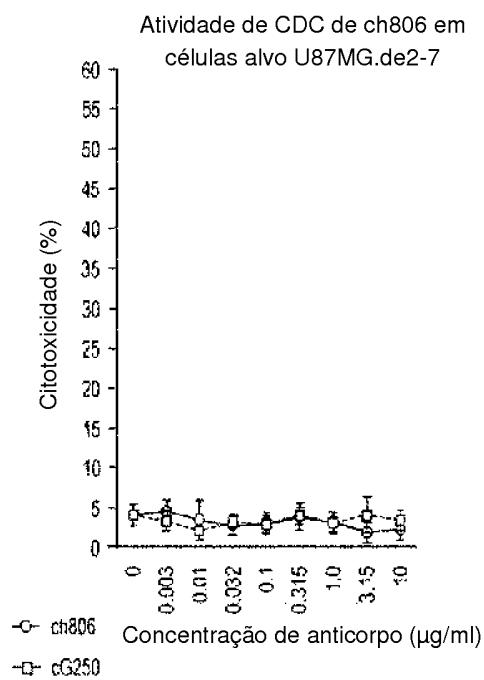


FIG. 37B

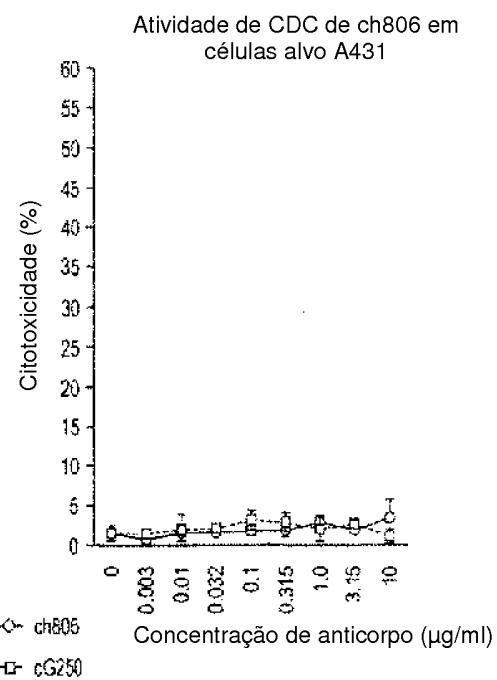
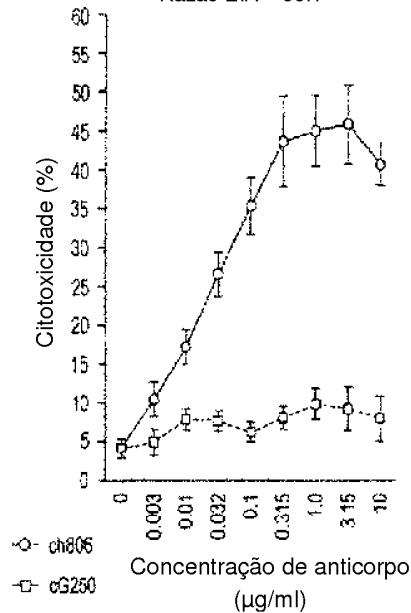


FIG. 38A

ADCC mediada por ch806 em células alvo U87MG.de2-7

Razão E:A = 50:1

**FIG. 38B**

ADCC mediada por ch806 em células alvo A431

Razão E:A = 50:1

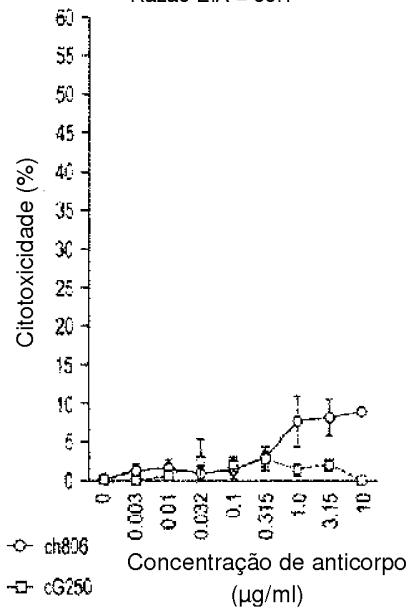


FIG. 39

ADCC mediada por 1 μ g/ml de ch806 em células alvo U87MG.de2-7
com diferentes razões E:A

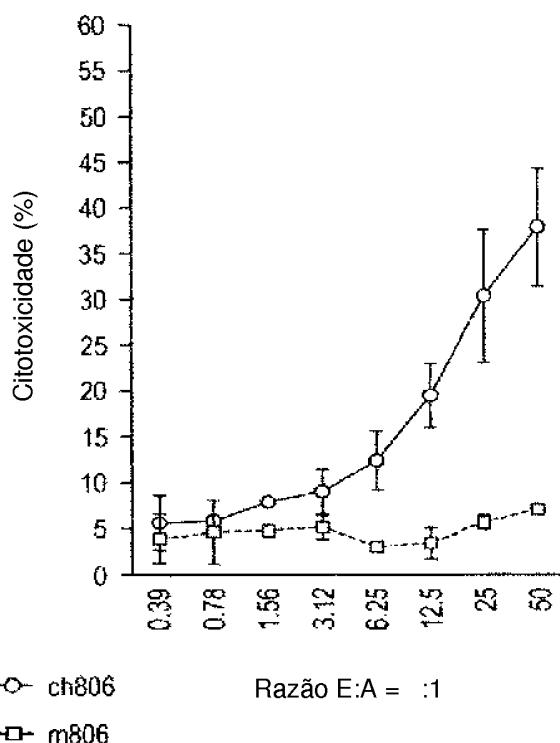


FIG. 40A

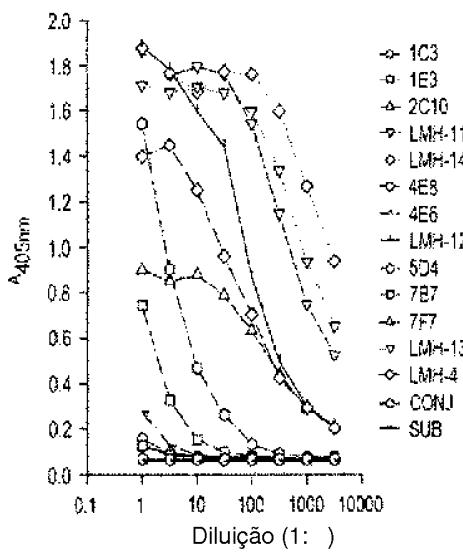


FIG. 40B

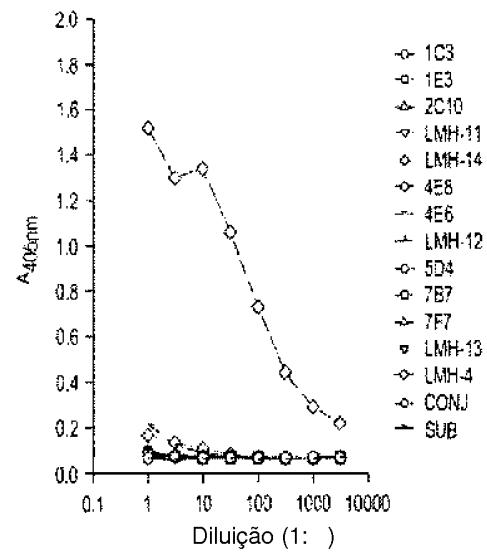
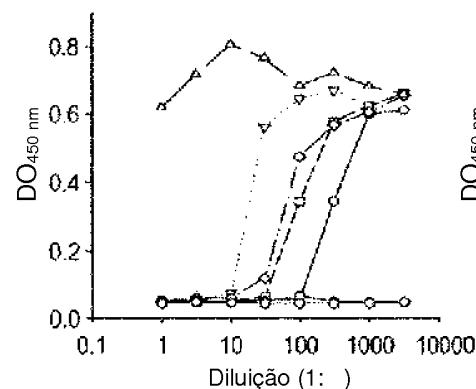


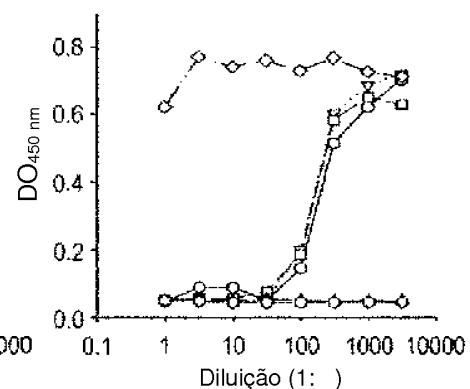
FIG. 41A



Legend for FIG. 41A:

- LMH-11 pre
- LMH-14 pre
- LMH-12 pre
- LMH-13 pre
- apenas ch806
- Conjugado
- Substrato

FIG. 41B



Legend for FIG. 41B:

- LMH-11 clone
- LMH-12 clone
- LMH-13 clone
- apenas ch806
- Conjugado
- Substrato

FIG. 41C

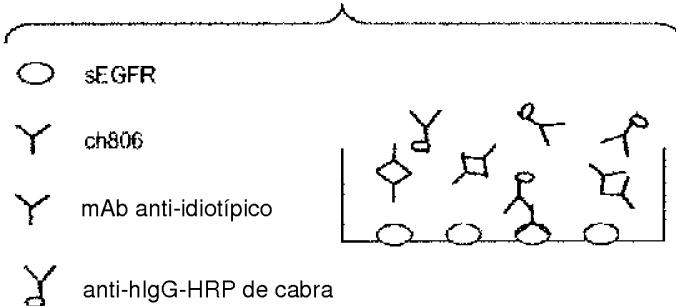
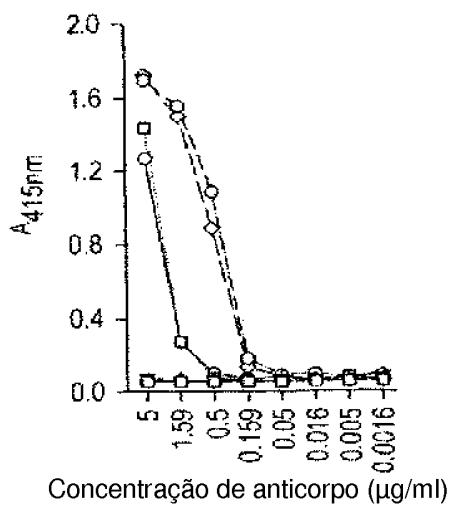
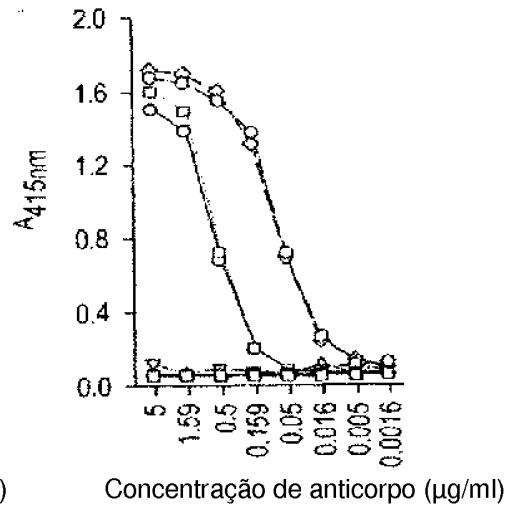


FIG. 42A



- ch806 - Soro
- ch806 - FCS a 1%/Meio
- △ h3S193 - Soro
- ▽ h3S193 - FCS a 1%/MeioM
- ◇ m806 - Soro
- m806 - FCS a 1%/Meio
- m3S193 - Soro
- + m3S193 - FCS a 1%/Meio
- avidina - HRP
- substrato ABTS

FIG. 42B



- ch806 - Soro
- ch806 - FCS a 1%/Meio
- △ h3S193 - Soro
- ▽ h3S193 - FCS a 1%/MeioM
- ◇ m806 - Soro
- m806 - FCS a 1%/Meio
- m3S193 - Soro
- + m3S193 - FCS a 1%/Meio
- avidina - HRP
- substrato ABTS

FIG. 42C

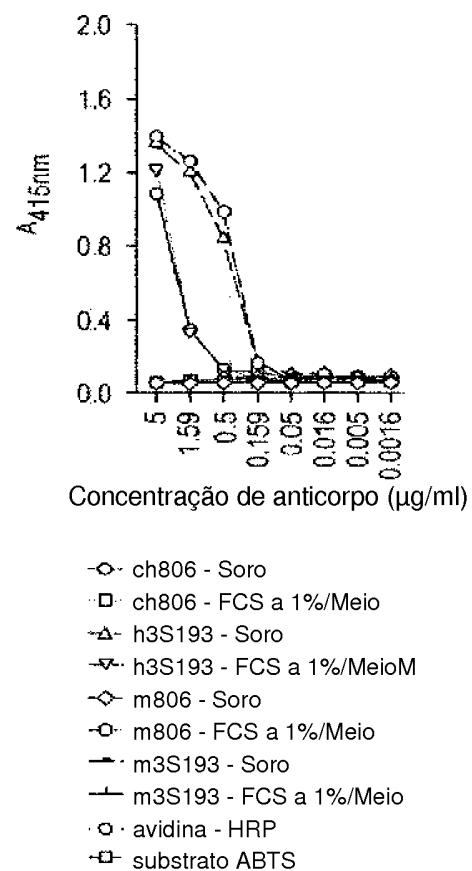


FIG. 43

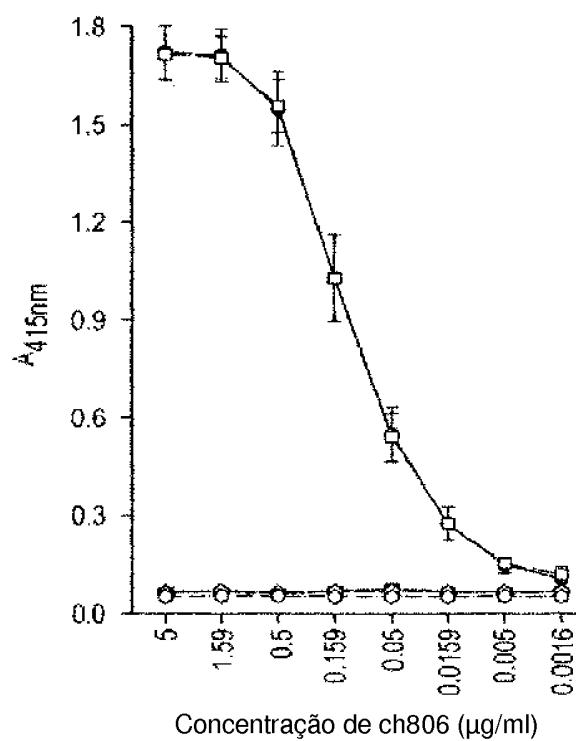
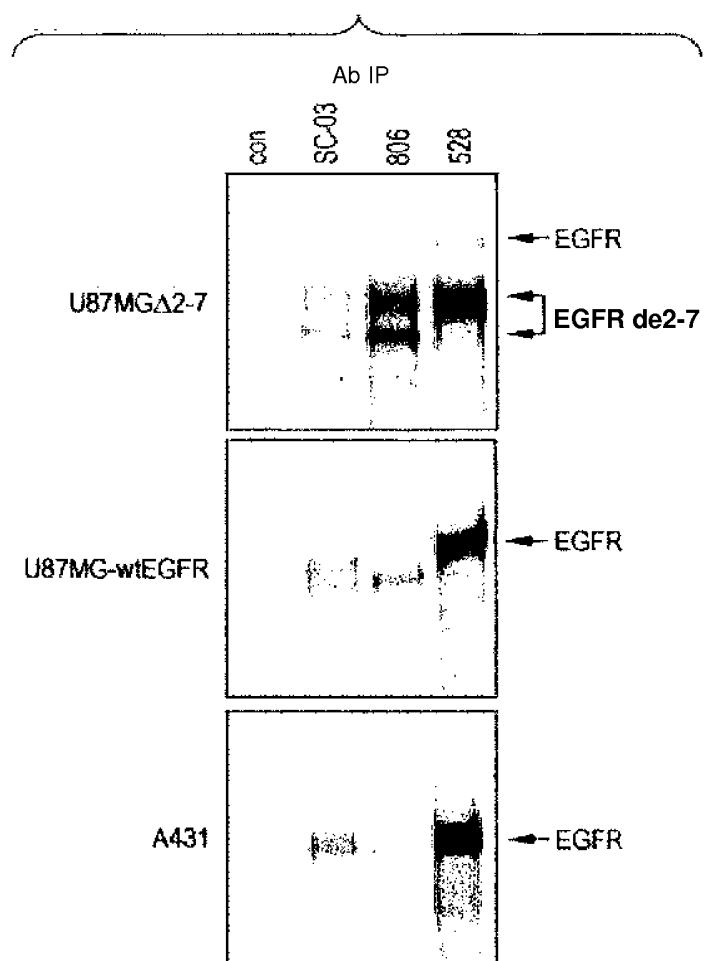


FIG. 44



FIG. 45



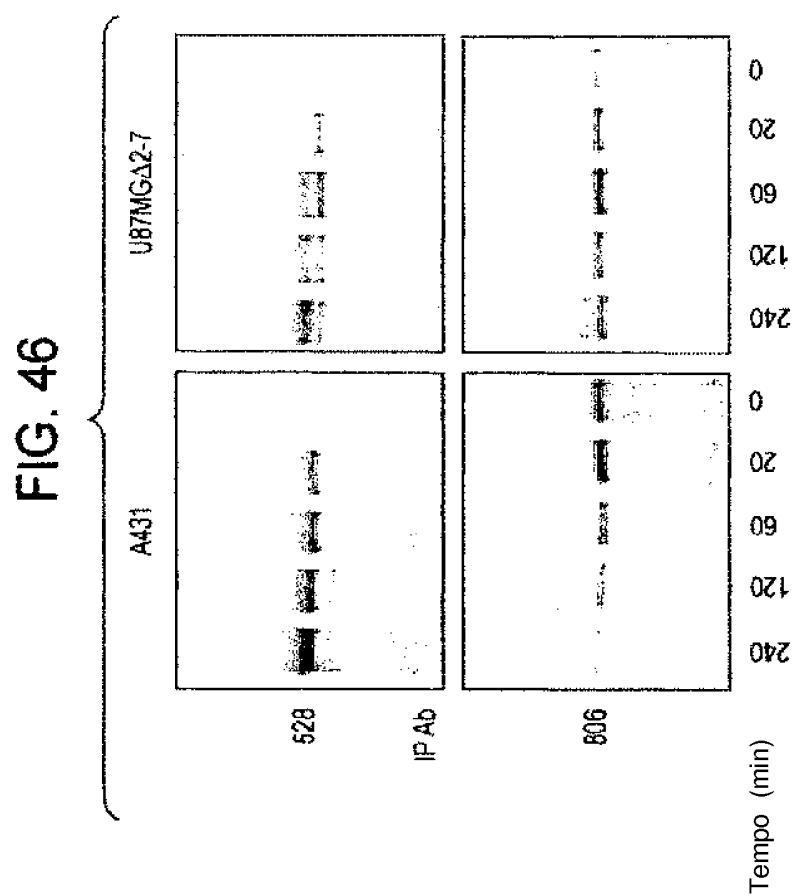


FIG. 47

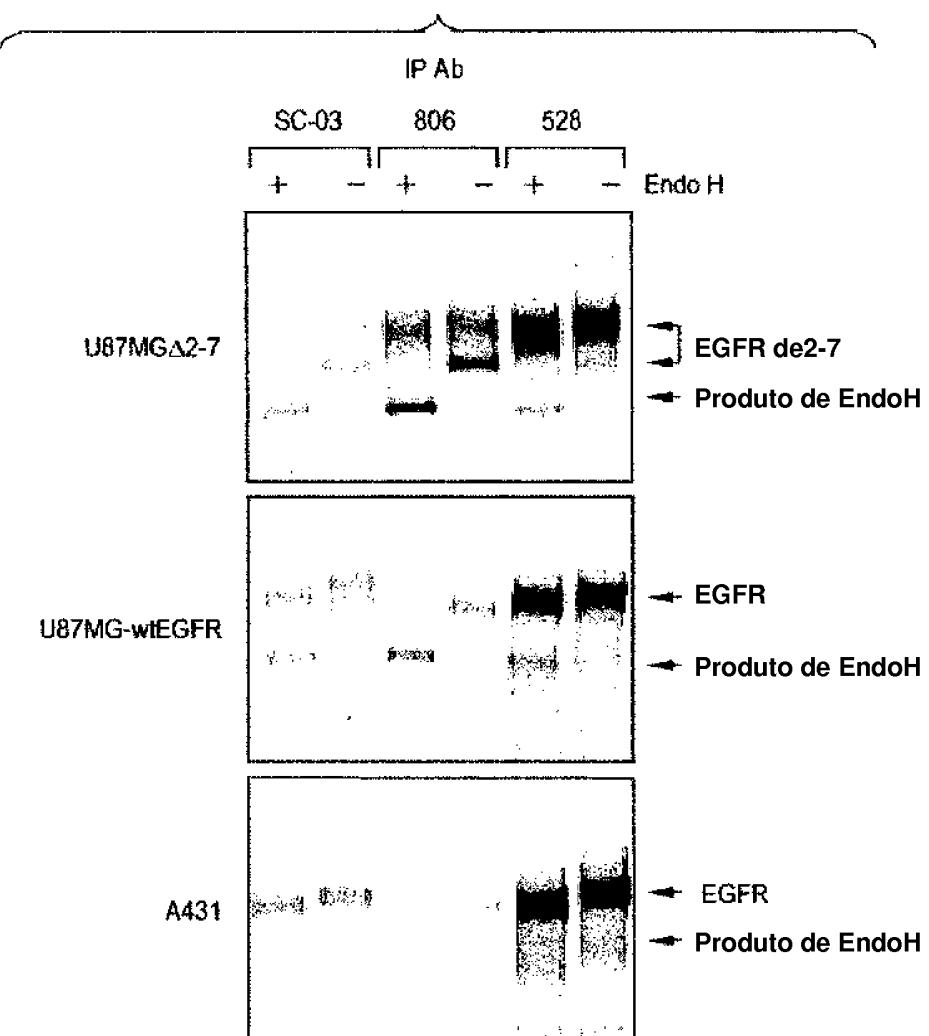


FIG. 48

