

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

(21) **PI0613259-6 A2**

(22) Data de Depósito: 19/05/2006
(43) Data da Publicação: 28/12/2010
(RPI 2086)



★ B R P I 0 6 1 3 2 5 9 A 2 ★

(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/68
G01N 33/564
A61K 39/00

(54) Título: **MÉTODO DE TRATAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA E KIT DE DIAGNÓSTICO**

(30) Prioridade Unionista: 20/05/2005 US 60/682,990

(73) Titular(es): GENENTECH, INC.

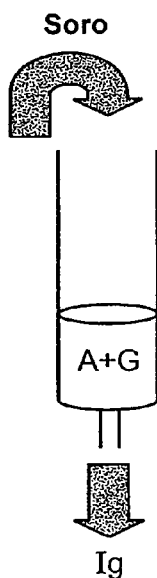
(72) Inventor(es): An Song, Krista Mccutcheon

(74) Procurador(es): CAROLINA NAKATA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006019576 de 19/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/127517 de 30/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO DE TRATAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA E KIT DE DIAGNÓSTICO. A presente invenção refere-se a método de tratamento prévio de amostra biológica de paciente com doença autoimune, a fim de evitar interferência, especialmente quando a amostra necessitar ser submetida a teste de atividade biológica com base em células, tal como teste de anticorpos neutralizantes.



“MÉTODO DE TRATAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA E KIT DE DIAGNÓSTICO”

Este é pedido não provisório que reivindica prioridade com base em 35 USC § 119 para o pedido provisório nº 60/682.990 depositado em vinte
5 de maio de 2005, cujo relatório descritivo é integralmente incorporado ao presente como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a método de tratamento prévio de amostra biológica de paciente com doença autoimune, a fim de evitar
10 interferência, especialmente quando a amostra necessitar ser submetida a teste de atividade biológica com base em células, tal como teste de anticorpo neutralizante.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os linfócitos são um dos muitos tipos de glóbulos brancos do sangue
15 produzidos na medula óssea durante o processo de hematopoiese. Existem duas populações principais de linfócitos: linfócitos B (células B) e linfócitos T (células T). Os linfócitos de interesse específico no presente são as células B.

As células B amadurecem na medula óssea e deixam a medula expressando anticorpo de ligação de antígenos sobre a sua superfície celular.
20 Quando célula B nativa encontra em primeiro lugar o antígeno para o qual o seu anticorpo ligado a membrana é específico, a célula começa a dividir-se rapidamente e a sua prole diferencia-se entre células B de memória e células efetoras, denominadas “células plasmáticas”. As células B de memória possuem período de vida mais longo e continuam a expressar anticorpo ligado
25 a membrana com a mesma especificidade da célula parental original. As células plasmáticas não produzem anticorpo ligado à membrana, mas sim produzem o anticorpo em forma que pode ser secretada. Os anticorpos secretados são as principais moléculas efetoras da imunidade humoral.

O antígeno CD20 (também denominado antígeno de diferenciação restrito por linfócitos B humanos, Bp35) é proteína transmembrana hidrofóbica com peso molecular de cerca de 35 kD localizada sobre linfócitos pré-B e B maduros. Valentine et al, *J. Biol. Chem.* 264 (19): 11282-11287 (1989) e Einfeld et al, *EMBO J.* 7 (3): 711-717 (1988). O antígeno também é expresso sobre mais de 90% dos linfomas não de Hodgkin (NHL) de células B (Anderson et al, *Blood* 63 (6): 1424-1433 (1984)), mas não é encontrado sobre células haste hematopoiéticas, células pró-B, células plasmáticas normal ou outros tecidos normais (Tedder et al, *J. Immunol.* 135 (2): 973-979 (1985)). Acredita-se que CD20 regule etapa(s) precoce(s) no processo de ativação para início e diferenciação do ciclo celular (Tedder et al, acima) e possivelmente funcione como canal de íons de cálcio. Tedder et al, *J. Cell. Biochem.* 14D: 195 (1990).

Dada a expressão de CD20 em linfomas de células B, este antígeno pode servir como possível "alvo" desses linfomas. Essencialmente, esses alvos podem ser generalizados conforme segue: anticorpos específicos para o antígeno de superfície CD20 de células B são administrados a paciente. Estes anticorpos anti-CD20 ligam-se especificamente ao antígeno CD20 de (ostensivamente) células B normais e malignas; o anticorpo ligado ao antígeno de superfície CD20 pode gerar a destruição e o esgotamento de células B neoplásicas. Além disso, agentes químicos ou marcas radioativas que possuem o potencial de destruição do tumor podem ser conjugados ao anticorpo anti-CD20 de tal forma que o agente seja especificamente "fornecido" para as células B neoplásicas. Independentemente da abordagem, objetivo primário é a destruição do tumor; a abordagem específica pode ser determinada pelo anticorpo anti-CD20 específico que é utilizado e, desta forma, as abordagens disponíveis para definir o alvo do antígeno CD20 podem variar consideravelmente.

O anticorpo rituxumab (RITUXAN®) é anticorpo monoclonal humano/murino quimérico geneticamente elaborado dirigido contra o antígeno CD20. Rituximab é o anticorpo denominado “C2B8” na Patente Norte-Americana nº 5.736.137, emitida em sete de abril de 1998 (Anderson et al).

5 Rituximab é indicado para o tratamento de pacientes com linfoma não de Hodgkin de células B, CD20-positivos, foliculares ou de grau baixo refratários ou retardados. *In vitro*, demonstrou-se que rituximab media citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e para induzir apoptose (Reff et al, *Blood* 83 (2): 435-445
10 (1994); Maloney et al, *Blood* 88: 637a (1996); Manches et al, *Blood* 101: 949-954 (2003)). Sinergia entre rituximab e quimioterapias e toxinas também foi observada experimentalmente. Particularmente, rituximab sensibiliza linhagens de células de linfoma de células B humanas resistentes a drogas aos efeitos citotóxicos de doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina de difteria e rícino (Demidem
15 et al, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12 (3): 177-186 (1997)). Estudos clínicos prévios *in vivo* demonstraram que rituximab esgota células B do sangue periférico, nódulos linfáticos e medula óssea de macacos cynomolgus. Reff et al, *Blood* 83: 435-445 (1994).

Rituximab também foi estudado em uma série de disfunções
20 autoimunes não malignas, nas quais as células B e autoanticorpos aparentemente desempenham papel na patofisiologia da doença. Edwards et al, *Biochem Soc. Trans.* 30: 824-828 (2002). Rituximab foi relatado como potencialmente reduzindo sinais e sintomas, por exemplo, de artrite reumatóide (RA) (Leandro et al, *Ann. Rheum. Dis.* 61: 883-888 (2002); Edwards et al,
25 *Arthritis Rheum.*, 46 (Supl. 9): S46 (2002); Stahl et al, *Ann. Rheum. Dis.*, 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Emery et al, *Arthritis Rheum.* 48 (9): S439 (2003)), lúpus (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5: 157–159 (2003); Leandro et al, *Arthritis Rheum.* 46: 2673–2677 (2002); Gorman et al, *Lupus*, 13: 312-316

(2004)), púrpura trombocitopênica imune (D'Arena et al, *Leuk. Lymphoma* 44: 561–562 (2003); Stasi et al, *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh et al, *Semin. Oncol.*, 27 (Supl. 12): 99-103 (2000); Zaia et al, *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn et al, *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)), aplasia dos glóbulos
5 vermelhos pura (Auner et al, *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)); anemia autoimune (Zaja et al, *Haematologica* 87: 189-195 (2002) (errata aparece em *Haematologica* 87: 336 (2002)), doença de aglutinina fria (Layios et al, *Leukemia*, 15: 187-8 (2001); Berentsen et al, *Blood*, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen et al, *Br. J. Haematol.*, 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090
10 (2001); Damiani et al, *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234 (2001)), síndrome do tipo B de resistência severa à insulina (Coll et al, *N. Engl. J. Med.*, 350: 310-311 (2004), crioglobulinemia mista (DeVita et al, *Arthritis Rheum.* 46 Supl. 9: S206/S469 (2002)), miastenia grave (Zaja et al, *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam et al, *J. Pediatr.*, 143: 674-677 (2003)), granulomatose de Wegener (Specks et al, *Arthritis &*
15 *Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)), pênfigo refratário vulgar (Dupuy et al, *Arch Dermatol.*, 140: 91-96 (2004)), dermatomiosite (Levine, *Arthritis Rheum.*, 46 (Supl. 9): S1299 (2002)), síndrome de Sjögren (Somer et al, *Arthritis & Rheumatism*, 49: 394-398 (2003)), crioglobulinemia mista do tipo II ativa (Zaja et al, *Blood*, 101: 3827-3834 (2003)), pênfigo vulgar (Dupay et al, *Arch. Dermatol.*, 140: 91-95 (2004)),
20 neuropatia autoimune (Pestronk et al, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74: 485–489 (2003)), síndrome de opsoclono-miocolono paraneoplásica (Pranzatelli et al, *Neurology* 60 (Supl. 1) PO5.128:A395 (2003)), e esclerose múltipla remitente/reincidente (RRMS). Cross et al (resumo), *Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS*, Oitava Reunião Annual do Comitê das Américas
25 para Pesquisa e Tratamento em Esclerose Múltipla, 20-21 (2003).

Foi conduzido estudo de Fase II (WA16291) em pacientes com artrite reumatóide (RA), fornecendo dados de acompanhamento por 48 semanas sobre a segurança e eficácia de rituximab. Emery et al, *Arthritis*

Rheum. 48 (9): S439 (2003); Szczepanski et al, *Arthritis Rheum.* 48 (9): S121 (2003); Edwards et al, *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*, *N. Engl. J. Med.* 350: 2572-82 (2004). Total de 161 pacientes foram aleatorizados homogeneamente para quatro formas de tratamento: metotrexato, rituximab isolado, rituximab mais metotrexato e rituximab mais ciclofosfamida (CTX). O regime de tratamento de rituximab foi um grama administrado por via intravenosa nos dias 1 e 15. Infusões de rituximab na maior parte dos pacientes com RA foram bem toleradas pela maior parte dos pacientes, com 36% dos pacientes experimentando pelo menos um evento adverso durante a sua primeira infusão (em comparação com 30% dos pacientes que receberam placebo). De forma geral, a severidade da maior parte dos eventos adversos foi considerada suave a moderada e foi bem equilibrada ao longo de todos os grupos de tratamento. Houve total de dezenove eventos adversos ao longo das quatro formas nas 48 semanas, que foram levemente mais freqüentes no grupo de rituximab/CTX. A incidência de infecções foi bem equilibrada em todos os grupos. A taxa média de infecções sérias nesta população de pacientes com RA foi de 4,66 por cem anos-paciente, que é mais baixa que a taxa de infecções que necessita de admissão hospitalar em pacientes com RA (9,57 por cem anos-paciente) relatada em estudo epidemiológico com base comunitária. Doran et al, *Arthritis Rheum.* 46: 2287–2293 (2002).

O perfil de segurança relatado de rituximab em pequeno número de pacientes com disfunções neurológicas, que incluem neuropatia autoimune (Pestronk et al, acima), síndrome de opsoclono-mioclono (Pranzatelli et al, acima) e RRMS (Cross et al, acima) foi similar ao relatado em oncologia ou RA. Em teste financiado por pesquisadores em andamento (IST) de rituximab em combinação com interferona- β (IFN- β) ou acetato de glatirâmero em pacientes com RRMS (Cross et al, acima), um dentre dez pacientes tratados foi admitido

no hospital para observação por uma noite depois de sofrer febre e rigores moderados após a primeira infusão de rituximab, enquanto os outros nove pacientes completaram o regime de quatro infusões sem nenhum evento adverso relatado.

5 As patentes e publicações de patentes referentes aos anticorpos CD20 e moléculas de ligação de CD20 incluem as Patentes Norte-Americanas nº 5.776.456, 5.736.137, 5.843.439, 6.399.061 e 6.682.734, bem como US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson et al); Patente Norte-Americana nº 6.455.043, US 10 2003/0026804 e WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez e White); WO 2000/27433 e US 2004/0213784 (Grillo-Lopez e Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky et al); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO 01/10461 (Rastetter e White); WO 2001/10460 (White e Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna e Hariharan); US 15 2002/0006404 e WO 2002/04021 (Hanna e Hariharan); US 2002/0012665 e WO 2001/74388 (Hanna, N.); US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan e Hanna); US 2002/0009444 e WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858 (White, C.); US 2002/0128488 e WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky et al); WO 2002/096948 (Braslawsky et al); WO 20 2002/079255 (Reff e Davies); Patente Norte-Americana nº 6.171.586 e WO 1998/56418 (Lam et al); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642 e Patente Norte-Americana nº 6.194.551, Patente Norte-Americana nº 6.242.195, Patente Norte-Americana nº 6.528.624 e Patente Norte-Americana nº 6.538.124 (Idusogie et al); WO 2000/42072 (Presta, L.); 25 WO 2000/67796 (Curd et al); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al); US 2002/0004587 e WO 2001/77342 (Miller e Presta); US 2002/0197256 (Grewal, I.); US 2003/0157108 (Presta, L.); WO 04/056312 (Lowman et al); US 2004/0202658 e WO 2004/091657 (Benyunes, K.); WO 2005/000351 (Chan,

A.); US 2005/0032130A1 (Beresini et al); US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.);
 Patentes Norte-Americanas nº 6.565.827, 6.090.365, 6.287.537, 6.015.542,
 5.843.398 e 5.595.721 (Kaminski et al); Patentes Norte-Americanas nº
 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108, 6.120.767 e 6.652.852 (Robinson et al);
 5 Patente Norte-Americana nº 6.410.391 (Raubitschek et al); Patente Norte-
 Americana nº 6.224.866 e WO 00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO
 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); US 2005/0079174A1 Barbera-Guillem et al);
 WO 2000/67795 (Goldenberg); US 2003/0133930 e WO 2000/74718
 (Goldenberg e Hansen); US 2003/0219433 e WO 2003/68821 (Hansen et al);
 10 WO 2004/058298 (Goldenberg e Hansen); WO 2000/76542 (Golay et al); WO
 2001/72333 (Wolin e Rosenblatt); Patente Norte-Americana nº 6.368.596
 (Ghetie et al); Patente Norte-Americana nº 6.306.393 e US 2002/0041847
 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner e Hartmann); WO 2002/102312
 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar et al); WO 2003/002607 (Leung, S.);
 15 WO 2003/049694, US 2002/0009427 e US 2003/0185796 (Wolin et al); WO
 2003/061694 (Sing e Siegall); US 2003/0219818 (Bohen et al); US
 2003/0219433 e WO 2003/068821 (Hansen et al); US 2003/0219818 (Bohen et
 al); US 2002/0136719 (Shenoy et al); WO 2004/032828 (Wahl et al); e WO
 2002/56910 (Hayden-Ledbetter). Vide também a Patente Norte-Americana nº
 20 5.849.898 e EP 330.191 (Seed et al); EP 332.865 A2 (Meyer e Weiss); Patente
 Norte-Americana nº 4.861.579 (Meyer et al); US 2001/0056066 (Bugelski et al);
 WO 1995/03770 (Bhat et al); US 2003/0219433 A1 (Hansen et al); WO
 2004/035607 (Teeling et al); US 2004/0093621 (Shitara et al); WO
 2004/103404 (Watkins et al); WO 2005/000901 (Tedder et al); US
 25 2005/0025764 (Watkins et al); WO 2005/016969 e US 2005/0069545 A1 (Carr
 et al); WO 2005/014618 (Chang et al).

As publicações referentes à terapia com rituximab incluem:

Perotta e Abuel, *Response of Chronic Relapsing ITP of 10 Years Duration to*

Rituximab, Resumo nº 3360, *Blood* 10 (1) (parte 1-2): pág. 88B (1998); Perotta et al, *Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)*, *Blood*, 94: 49 (resumo) (1999); Matthews, R., *Medical Heretics*, *New Scientist* (sete de abril de 2001); Leandro et al, *Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response*, *Arthritis and Rheumatism* 44 (9): S370 (2001); Leandro et al, *An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus*, *Arthritis and Rheumatism*, 46: 2673–2677 (2002), em que, durante período de duas semanas, cada paciente recebeu duas infusões de 500 mg de rituximab, duas
 5 infusões de 750 mg de ciclofosfamida e corticoesteróides orais com alta dosagem e em que dois dos pacientes tratados sofreram reincidência após sete e oito meses, respectivamente, e foram tratados novamente, embora com protocolos diferentes; Weide et al, *Successful Long-Term Treatment of Systemic Lupus Erythematosus with Rituximab Maintenance Therapy*, *Lupus*, 12: 779-
 10 782 (2003), em que paciente foi tratado com rituximab (375 mg/m² x 4, repetido em intervalos semanais) e aplicações de rituximab adicionais foram fornecidas a cada cinco ou seis meses e, em seguida, terapia de manutenção foi recebida com 375 mg/m² de rituximab a cada três meses e segundo paciente com SLE refratário foi tratado com sucesso com rituximab e está recebendo terapia de
 15 manutenção a cada três meses, em que os dois pacientes reagem bem a terapia com rituximab; Edwards e Cambridge, *Sustained Improvement in Rheumatoid Arthritis Following a Protocol Designed to Deplete B Lymphocytes*, *Rheumatology* 40: 205-211 (2001); Cambridge et al, *B Lymphocyte Depletion in Patients with Rheumatoid Arthritis: serial studies of immunological parameters*,
 20 *Arthritis Rheum.*, 46 (Supl. 9): S1350 (2002); Edwards et al, *Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A Randomized, Placebo Controlled Trial in Patients with Rheumatoid Arthritis*, *Arthritis and Rheumatism* 46 (9): S197 (2002); Pavelka et al, *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):
 25

289-90 (2004); Emery et al, *Arthritis Rheum.* 50 (S9): S659 (2004); Levine e Pestronk, *IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab*, *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita et al, *Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis*, *Arthritis & Rheum.* 46: 2029-2033 (2002); Hidashida et al, *Treatment of DMARD-Refractory Rheumatoid Arthritis with Rituximab*, apresentado na Reunião Científica Anual da Faculdade Norte-Americana de Reumatologia, 24 a 29 de outubro, Nova Orleans LA, 2002; Tuscano, J., *Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab*, apresentado na Reunião Científica Anual da Faculdade Norte-Americana de Reumatologia, 24 a 29 de outubro; Nova Orleans LA, 2002; *Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic*, Martin e Chan, *Immunity* 20: 517-527 (2004); Silverman e Weisman, *Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy*, *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz e Isenberg, *Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases*, *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004); Virgolini e Vanda, *Rituximab in autoimmune diseases*, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299-309 (2004); Klemmer et al, *Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab*, *Arthritis and Rheumatism*, 48: (9) S624-S624 (2003); Kneitz et al, *Effective B Cell Depletion with Rituximab in the Treatment of Autoimmune Diseases*, *Immunobiology*, 206: 519-527 (2002); Arzoo et al, *Treatment of Refractory Antibody Mediated Autoimmune Disorders with an anti-CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab)*, *Annals of the Rheumatic Disease*, 61 (10), pág. 922-4 (2002), *Comment in Ann. Rheum. Dis.* 61: 863-866 (2002); *Future Strategies in Immunotherapy* de Lake e Dionne, em *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003 por John Wiley & Sons, Inc.), data de envio online do artigo: quinze de janeiro de 2003 (Capítulo 2, *Antibody-Directed*

Immunotherapy); Liang e Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*,
 Capítulo: *CD20 as an Immunotherapy Target*, data de envio online do artigo:
 quinze de janeiro de 2002 intitulado *CD20*; Apêndice 4A intitulado *Monoclonal*
Antibodies to Human Cell Surface Antigens por Stockinger et al, eds.: Coligan
 et al, em *Current Protocols in Immunology* (2003, John Wiley & Sons, Inc) data
 5 de envio online: maio de 2003; data de publicação impressa: fevereiro de 2003;
 Penichet e Morrison, *CD Antibodies/Molecules: Definition; Antibody Engineering*
 em *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, capítulo: *Chimeric, Humanized*
and Human Antibodies; enviado online em quinze de janeiro de 2002; Specks
 et al, *Response of Wegener's Granulomatosis to anti-CD20 Chimeric*
 10 *Monoclonal Antibody Therapy*, *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001);
 apresentação do resumo online e convite, Koegh et al, *Rituximab for Remission*
Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-
Label Pilot Trial in 10 Patients, Faculdade Norte-Americana de Reumatologia,
 15 Sessão Número: 28-100, Sessão Título: *Vasculitis*, Sessão Tipo: *ACR*
Concurrent Session, Primary Category: 28 Vasculitis, Sessão de 18 de outubro
 de 2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson,
Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis
treated with rituximab, *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003);
 20 Jayne et al, *B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis*, *Kidney and*
Blood Pressure Research, 26: 294 (2003); Jayne, pôster 88 (11º Workshop
 Internacional da ANCA e Vasculite), 2003 Sociedade Norte-Americana de
 Nefrologia; Stone e Specks, *Rituximab Therapy for the Induction of Remission*
and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis, no Resumo de Pesquisa de
 25 Testes Clínicos da Rede de Tolerância Imunológica 2002-2003,
<http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>. Vide
 também Leandro et al, *B cell repopulation occurs mainly from naïve B cells in*
patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Arthritis*

Rheum., 48 (Supl. 9): S1160 (2003).

O Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0068664 (Albitar et al) descreve teste ELISA para determinar anticorpo anti quimérico humano (HACA) dirigido contra Rituximab.

5 O Pedido de Patente Norte-Americano nº US 2005/0032130A1 (Beresini e Song) descreve método de detecção de anticorpos neutralizantes para anticorpo terapêutico, tal como anticorpo CD20.

Mire-Sluis et al, *J. Immunol. Methods* 289: 1-16 (2004) fornece recomendações para detecção e otimização de imunotestes utilizados na
10 detecção de anticorpos hospedeiros contra produtos de biotecnologia.

Hong et al descrevem ELISA com base em anticorpo antiidiotípico e célula viva quantitativa simples para anticorpo humanizado dirigido contra a proteína da superfície celular CD20 (Hong et al, *J. Immunol. Methods* 294: 189-197 (2004)).

Wei et al, *J. Immunol. Methods* 293: 115-26 (2004) descrevem
15 bioteste com base em células para detecção de anticorpos neutralizantes contra eritropoietina humana recombinante em estudos clínicos.

Leon et al descrevem interferência por atividade de fator reumatóide na detecção de anticorpos antiavários em criadores de pombos (Leon et al, *Clin. Exp. Med.* 2 (2): 59-67 (2002); errata em: Leon et al, *Clin. Exp.*
20 *Med.* 2 (3): 157 (2002)). Stahl et al, *Vox Sang.* 74 (4): 253-255 (1998) referem-se a cromatografia de afinidade em soro para a detecção de aloanticorpos IgG em paciente com aglutinas frias de IgM com alto título. Koper et al, *Clin. Chem. Lab. Med.* 36 (1): 23-28 (1998) quantificaram interferência de anticorpos anticamundongos humanos (HAMA) IgG e IgM em medições de CA125
25 utilizando cromatografia de afinidade. Crowley e Walters referem-se à determinação de imunoglobulinas em soro sanguíneo por meio de cromatografia de afinidade de alto desempenho (Crowley e Walters, *J. Chromatogr.* 266: 157-162 (1983)).

Vide também Maeda et al, *Intl. J. Hematology* 74 (1): 70-75 (2001); Gordon et al, *Blood* 98 (11 Parte 2): 228b (2001); Kaminski et al, *Blood* 96 (11 Parte 1): 734a (2000); Shan et al, *Cancer Immunology Immunotherapy* 48 (12): 673-683 (2000); Idusogie et al, *Journal of Immunology* 166 (4): 2571-2575 (2001); Reff et al, *Blood* 83 (2): 435-445 (1994); e Zaya et al, *Blood* 98 (11 Parte 2): 41b (2001).

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, ao menos em parte, à revelação de que soro de pacientes com doenças autoimunes, tais como RA ou SLE, contém substância(s) que interfere(m) no desempenho de bioteste com base em células, tal como teste de anticorpo neutralizante. Vários métodos para abordar o problema de interferência foram testados, até que a purificação por afinidade de imunoglobulina foi identificada como o método preferido de remoção da interferência, de forma que resultados mais confiáveis pudessem ser atingidos no bioteste.

Conseqüentemente, em primeiro aspecto, a presente invenção fornece método de tratamento de amostra biológica de paciente com doença autoimune que compreende:

- (a) deslipidação da amostra;
- (b) purificação por afinidade de imunoglobulinas na amostra;
- (c) concentração das imunoglobulinas purificadas; e
- (d) submissão das imunoglobulinas concentradas a teste de atividade biológica com base em células

A presente invenção fornece ainda método de tratamento de paciente com doença autoimune que compreende:

- (a) administração de anticorpo terapêutico ou imunoadesina ao paciente para tratamento da doença autoimune;
- (b) obtenção de amostra biológica do paciente;

(c) purificação por afinidade de imunoglobulinas na amostra biológica; e

(d) submissão das imunoglobulinas purificadas a teste de anticorpos neutralizantes.

Para uso nos métodos acima, a presente invenção fornece ainda kit de diagnóstico que compreende:

(a) reagente de deslipidação;

(b) tampões para purificação por afinidade de imunoglobulinas; e

(c) manual de instruções que instrui o usuário do kit de diagnóstico a praticar qualquer dos métodos acima ou ambos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1A é alinhamento de seqüências que compara as seqüências de aminoácidos do domínio leve variável (V_L) de cada um dos 2H7 murinos (SEQ ID N° 1), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID N° 2) e do subgrupo I de cadeia leve capa humano (SEQ ID N° 3). As CDRs de V_L de 2H7 e hu2H7.v16 são as seguintes: CDR1 (SEQ ID N° 4), CDR2 (SEQ ID N° 5) e CDR3 (SEQ ID N° 6).

A Fig. 1B é alinhamento de seqüências que compara as seqüências de aminoácidos do domínio pesado variável (V_H) de cada um dos 2H7 murinos (SEQ ID N° 7), variante 2H7.v16 humanizada (SEQ ID N° 8) e da seqüência de consenso humana do subgrupo III de cadeia pesada (SEQ ID N° 9). As CDRs de V_H de 2H7 e hu2H7.v16 são as seguintes: CDR1 (SEQ ID N° 10), CDR2 (SEQ ID N° 11) e CDR3 (SEQ ID N° 12).

Na Fig. 1A e na Fig. 1B, as CDR1, CDR2 e CDR3 em cada cadeia são incluídas entre parênteses, ladeadas pelas regiões de estrutura, FR1 a FR4, conforme indicado. 2H7 indica o anticorpo 2H7 murino. Os asteriscos entre duas fileiras de seqüências indicam as posições que são diferentes entre as duas seqüências. A numeração de resíduos é de acordo com Kabat et al,

Sequences of Immunological Interest, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991), com as inserções exibidas como a, b, c, d e e.

5 A Fig. 2 exibe alinhamento das cadeias leves de 2H7.v16 e 2H7.v511 maduras (SEQ ID Nº 13 e 15, respectivamente), com numeração de resíduos de domínio variável de Kabat e numeração de resíduos de domínio constante de Eu.

10 A Fig. 3 exibe alinhamento das cadeias pesadas de 2H7.v16 e 2H7.v511 maduras (SEQ ID Nº 14 e 16, respectivamente), com numeração de resíduos de domínio variável de Kabat e numeração de resíduos de domínio constante de Eu.

A Fig. 4 ilustra citotoxicidade dependente de complemento (CDC) como teste de anticorpo neutralizante (NAb) para Rituximab.

15 A Fig. 5 representa CDC como teste de NAb com relação às amostras a seguir: controle, anticorpos CDR anti-rituximab de cabra e anticorpos anti-Fc humano de cabra.

A Fig. 6 exibe tolerância de soro no teste de CDC NAb, que compara resultados de soro de pacientes humanos normais (esquerda) e soro de pacientes com artrite reumatóide (RA) (direita).

20 A Fig. 7 representa leitura de teste do teste de CDC NAb para: Teste de Viabilidade Celular Luminescente CELLTITER-GLO®, calceína, desidrogenase de lactose (LDH) e ALAMAR BLUE® (resazurin).

A Fig. 8 compara interferência de soro de RA que compreende ALAMAR BLUE® (resazurin) (esquerda) ou CELLTITER-GLO® (direita) para
25 leitura de teste.

A Fig. 9 ilustra procedimento preferido para tratamento prévio de soro no presente.

A Fig. 10 exibe o efeito de tratamento prévio de soro sobre a

leitura de soro com RA sem tratamento prévio de soro (esquerda) e com tratamento prévio de soro (direita).

A Fig. 11 ilustra o efeito da variação do número celular utilizado no teste NAb.

5 A Fig. 12 representa a seleção de dose de rituximab, sensibilidade a NAb.

A Fig. 13 exhibe interferência de drogas em teste de NAb com razões NAb: Rituxan de 0,1 (esquerda) ou 5,1 (direita).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10

DEFINIÇÕES

A menos que indicado em contrário, por “amostra biológica” no presente, indica-se amostra obtida de paciente humano. O paciente é preferencialmente paciente com doença autoimune. A amostra pode compreender imunoglobulinas do paciente que se liga a anticorpo ou droga com o qual o paciente pode haver sido tratado, tal como anticorpo antimurino humano (HAMA), anticorpo antiquimérico humano (HACA) ou anticorpo anti-humano humano (HAHA). A amostra biológica pode compreender, por exemplo, soro, plasma, lisato celular, leite, saliva, fluido vítreo, fluido sinovial, fluido da cavidade peritoneal, fluido lacrimal, homogenado de tecido, mas
15 preferencialmente soro. A amostra pode ser de paciente que tenha sido tratado com droga (neste caso, a amostra pode compreender adicionalmente a droga, tal como anticorpo terapêutico ou imunoadesina), ou pode ser de paciente nativo de droga ou não tratado.
20

“Doença autoimune” no presente designa doença ou disfunção que surge dos próprios tecidos ou órgãos do indivíduo e é dirigida contra eles, sua manifestação, co-secretado ou condição resultante. Em uma realização, refere-se a uma condição que resulta da produção por células B de anticorpos que são reativos com antígenos e tecidos normais do corpo, ou por ela é
25

agravada. Em outras realizações, a doença autoimune envolve a secreção de autoanticorpo que é específico para epítopo a partir de auto-antígeno (tal como antígeno nuclear). Exemplos de doenças ou disfunções autoimunes incluem, mas sem limitar-se a artrite (artrite reumatóide, tal como artrite aguda, artrite reumatóide crônica, gota ou artrite da gota, artrite da gota aguda, artrite imunológica aguda, artrite inflamatória crônica, artrite degenerativa, artrite induzida por colágeno do tipo II, artrite infecciosa, artrite de Lyme, artrite proliferativa, artrite psoriática, mal de Still, artrite vertebral e artrite reumatóide de início juvenil, osteoartrite, artrite crônica progressiva, artrite deformans, poliartrite crônica primária, artrite reativa e espondilite anquilosante), doenças da pele hiperproliferativas inflamatórias, psoríase tal como psoríase de placas, psoríase gutatte, psoríase pustular e psoríase das unhas, atopia incluindo doenças atópicas tais como febre do feno e síndrome de Job, dermatite incluindo dermatite de contato, dermatite de contato crônica, dermatite esfoliativa, dermatite alérgica, dermatite de contato alérgica, dermatite herpetiforme, dermatite numular, dermatite seborréica, dermatite não específica, dermatite de contato irritante primária e dermatite atópica, síndrome de hiper IgM ligada por x, doenças inflamatórias intraoculares alérgicas, urticária tal como urticária alérgica crônica e urticária idiopática crônica, incluindo urticária autoimune crônica, miosite, polimiosite/dermatomiosite, dermatomiosite juvenil, necrólise epidérmica tóxica, escleroderma (incluindo escleroderma sistêmico), esclerose tal como esclerose sistêmica, esclerose múltipla (MS) tal como MS espinhoótica, MS progressiva primária (PPMS) e MS recorrente (RRMS), esclerose sistêmica progressiva, aterosclerose, arteriosclerose, esclerose disseminada, esclerose atáxica, neuromielite ótica (NMO), doença intestinal inflamatória (IBD) (por exemplo, mal de Crohn, doenças gastrointestinais mediadas por autoimunidade, colite tal como colite ulcerativa, colite ulcerosa, colite microscópica, colite colagenosa, colite

poliposa, enterocolite necrotizante e colite transmural, bem como doença intestinal inflamatória autoimune), inflamação intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangite esclerosante primária, síndrome de mal-estar respiratório, incluindo síndrome de mal-estar respiratório em adultos ou aguda (ARDS), meningite, inflamações totais ou parciais da úvea, irite, coroidite, 5 disfunção hematológica autoimune, espondilite reumatóide, sinovite reumatóide, angioedema hereditário, lesões dos nervos cranianos tais como em meningite, herpes gestacional, penfigóide gestacional, prurite scroti, falha ovariana prematura autoimune, perda súbita da audição devida a condição autoimune, doenças mediadas por IgE tais como anafilaxia e rinite alérgica e 10 atópica, encefalite tal como encefalite de Rasmussen e encefalite dos membros e/ou do tronco cerebral, uveíte tal como uveíte anterior, uveíte anterior aguda, uveíte granulomatosa, uveíte não granulomatosa, uveíte facoantigênica, uveíte posterior ou uveíte autoimune, glomerulonefrite (GN) com e sem síndrome nefrótica tal como glomerulonefrite aguda ou crônica como GN primária, GN 15 mediada imune, GN membranosa (nefropatia membranosa), GN membranosa idiopática ou nefropatia membranosa idiopática, GN membranoproliferativa ou proliferativa membranosa (MPGN), incluindo Tipo I e Tipo II, bem como GN de rápida progressão, nefrite proliferativa, falha endócrina poliglandular autoimune, balanite incluindo balanite circunscrita plasmacelular, balanopostite, centrífugo anular de eritema, eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma 20 anular, lichen nitidus, lichen sclerosus et atrophicus, lichen simplex chronicus, lichen spinulosus, lichen planus, ictiose lamelar, hiperqueratose epidermolítica, queratose pré-maligna, pioderma gangrenoso, reações e condições alérgicas, reações alérgicas, eczema incluindo eczema alérgico ou atópico, eczema 25 asteótico, eczema disidrótico e eczema palmoplantar vesicular, asma, tal como asma dos brônquios, asma brônquica e asma autoimune, condições que envolvem a infiltração de células T e reações inflamatórias crônicas, reações

imunes contra antígenos exógenos tais como grupos sangüíneos A-B-O fetais durante a gravidez, doença inflamatória pulmonar crônica, miocardite autoimune, deficiência da adesão de leucócitos, lúpus incluindo lúpus nefrite, lúpus cerebrite, lúpus pediátrico, lúpus não renal, lúpus extra-renal, lúpus discóide e eritematose do lúpus discóide, alopecia lúpus, eritematose do lúpus sistêmico (SLE) tal como SLE cutâneo ou SLE cutâneo subagudo, síndrome do lúpus neonatal (NLE) e eritematose do lúpus disseminada, diabetes mellitus de início juvenil (Tipo I), incluindo diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM) pediátrica, diabetes mellitus de início em adultos (diabetes Tipo II), diabetes autoimune, diabetes insipidus idiopática, retinopatia diabética, nefropatia diabética, disfunção de artérias grandes diabética, reações imunes associadas à hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose incluindo granulomatose linfomatóide, granulomatose de Wegener, agranulocitose, vasculitide incluindo vasculite, vasculite de vasos grandes (incluindo polimialgia reumática e artrite de células gigantes (de Takayasu)), vasculite de vasos médios (incluindo mal de Kawasaki e poliartrite nodosa/periartrose nodosa), poliartrite microscópica, imunovasculite, vasculite do SNC, vasculite cutânea, vasculite por hipersensibilidade, vasculite necrotizante tal como vasculite necrotizante sistêmica e vasculite associada a ANCA, tal como síndrome ou vasculite de Churg-Strauss (CSS) e vasculite de vasos pequenos associada a ANCA, artrite temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoimune, anemia positiva de Coombs, anemia Diamond Blackfan, anemia hemolítica ou anemia hemolítica imune incluindo anemia hemolítica autoimune (AIHA), anemia perniciosa, mal de Addison, aplasia ou anemia de glóbulos vermelhos pura (PRCA), deficiência de Fator VIII, hemofilia A, neutropenia autoimune, pancitopenia, leucopenia, doenças que envolvam a diapedese de leucócitos, doenças inflamatórias do SNC, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, síndrome de lesões a múltiplos órgãos tais como as que se

seguem a septicemia, trauma ou hemorragia, doenças mediadas por complexo de antígeno e anticorpo, doença da membrana base anti-glomerular, síndrome de anticorpos anti-fosfolipídios, neurite alérgica, mal/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, 5 síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigóide tal como penfigóide bolhosa e penfigóide da pele, pênfigo (incluindo pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, penfigóide do muco-membrana do pênfigo e pênfigo eritematoso), poliendocrinopatias autoimunes, síndrome ou mal de Reiter, lesão térmica, preeclampsia, disfunção do complexo imune tal como nefrite do 10 complexo imune, nefrite mediada por anticorpos, polineuropatias, neuropatia crônica tal como polineuropatias IgM ou neuropatia mediada por IgM, trombocitopenia (conforme desenvolvido por pacientes com enfarte do miocárdio, por exemplo), incluindo púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), púrpura pós-transfusão (PTP), trombocitopenia induzida por heparina e 15 trombocitopenia autoimune ou mediada por imunidade tal como púrpura trombocitopênica idiopática (ITP) incluindo ITP crônica ou aguda, esclerite tal como ceratoesclerite idiopática, episclerite, doença autoimune dos testículos e ovário incluindo orquite autoimune e ooforite, hipotireoidismo primário, hipoparatiroidismo, doenças endócrinas autoimunes incluindo tireoidite tal 20 como tireoidite autoimune, mal de Hashimoto, tireoidite crônica (tireoidite de Hashimoto) ou tireoidite subaguda, mal da tireóide autoimune, hipotireoidismo idiopático, mal de Grave, síndromes poliglandulares tais como síndromes poliglandulares autoimunes (ou síndromes de endocrinopatia poliglandular), síndromes paraneoplásicas, incluindo síndromes paraneoplásicas neurológicas 25 tais como síndrome miastênica de Lambert-Eaton ou síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de rigidez humana ou de rigidez pessoal, encefalomielite tal como encefalomielite alérgica ou alergia de encefalomielite e encefalomielite alérgica experimental (EAE), miastenia grave tal como miastenia grave

associada a timoma, degeneração do cerebelo, neuromiotonia, opsoclonus ou síndrome de opsoclonus mioclonus (OMS) e neuropatia sensorial, neuropatia motor multifocal, síndrome de Sheehan, hepatite autoimune, hepatite crônica, hepatite lúpide, hepatite de células gigantes, hepatite ativa crônica ou hepatite
5 ativa crônica autoimune, pneumotite intersticial linfóide (LIP), bronquiolite obliterans (não de transplante) contra NSIP, síndrome de Guillain-Barré, mal de Berger (nefropatia de IgA), nefropatia de IgA idiopática, dermatose de IgA linear, dermatose neutrofílica febril aguda, dermatose pustular subcorneana, dermatose acantolítica transitória, cirrose tal como cirrose biliar primária e
10 pneumonocirrose, síndrome de enteropatia autoimune, doença celíaca, psilose celíaca (enteropatia do glúten), psilose refratária, psilose idiopática, crioglobulinemia, esclerose lateral amiotrófica (ALS; mal de Lou Gehrig), doença das artérias coronarianas, doença dos ouvidos autoimune tal como doença dos ouvidos interna autoimune (AIED), perda de audição autoimune,
15 policondrite tal como policondrite refratária, retardada ou reincidente, proteinose alveolar pulmonar, síndrome de Cogan/queratite intersticial não sífilítica, paralisia de Bell, mal/síndrome de Sweet, rosácea autoimune, dor associada a zóster, amiloidose, esclerite, linfocitose não cancerosa, linfocitose primária, que inclui linfocitose de células B monoclonais (tal como gamopatia
20 monoclonal benigna e gamopatia monoclonal de significado indeterminado, MGUS), neuropatia periférica, síndrome paraneoplásica, canalopatias tais como epilepsia, enxaqueca, arritmia, disfunções musculares, surdez, cegueira, paralisia periódica e canalopatias do SNC, autismo, miopatia inflamatória, glomeruloesclerose focal, segmental ou segmental focal (FSGS), oftalmopatia
25 endócrina, uveorretinite, coriorretinite, disfunção hepatológica autoimune, fibromialgia, falha endócrina múltipla, síndrome de Schmidt, adrenalite, atrofia gástrica, demência pré-senil, doenças demielinantes tais como doenças demielinantes autoimunes e polineuropatia demielinante inflamatória crônica,

síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, dismobildade do esôfago, esclerodactília e telangiectasia), infertilidade autoimunológica masculina e feminina devido, por exemplo, a anticorpos anti-espermatozóides, doença de tecidos conjuntivos
5 misturados, doença de Chagas, febre reumática, aborto recorrente, pulmão de fazendeiro, eritema multiforme, síndrome pós-cardiotomia, síndrome de Cushing, pulmão de criador de pássaros, angite granulomatosa alérgica, angite linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolite tal como alveolite alérgica e alveolite fibrosante, doença pulmonar intersticial, reação de transfusão,
10 hanseníase, malária, doenças parasíticas tais como leishmaníase, cianossomíase, esquistossomíase, ascaríase, aspergilose, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocardite, fibrose do endomiocárdio, fibrose pulmonar intersticial difusa, fibrose pulmonar intersticial, fibrose pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, fibrose cística, endoftalmite, eritema
15 elevatum et diutinum, eritroblastose fetal, facite eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flaríase, ciclite tal como ciclite crônica, ciclite heterocrônica, iridociclite (aguda ou crônica) ou ciclite de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), SCID, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), infecção por ecovírus,
20 sepsia, endotoxemia, pancreatite, tireotoxicose, infecção por parvovírus, infecção por vírus da rubéola, síndromes pós-vacinação, infecção por rubéola congênita, infecção por vírus Epstein-Barr, caxumba, síndrome de Evan, falha gonadal autoimune, coréia de Sydenham, nefrite pós-estreptococo, tromboangite obliterans, tireotoxicose, tabes dorsalis, coriodite, polimialgia de células gigantes,
25 pneumonite por hipersensibilidade crônica, ceratoconjuntivite seca, ceratoconjuntivite epidêmica, síndrome nefrítica idiopática, nefropatia por mudanças mínimas, lesões por reperfusão de isquemia e familiar benigna, reperfusão de órgãos de transplante, autoimunidade da retina, inflamação das

juntas, bronquite, doença pulmonar/das vias aéreas obstruídas crônica,
 silicose, aftas, estomatite aftosa, disfunções arterioscleróticas,
 aspermio gênese, hemólise autoimune, mal de Boeck, crioglobulinemia,
 contratura de Dupuytren, endoftalmia facoanafilática, enterite alérgica, eritema
 5 nodosum leprosum, paralisia facial idiopática, síndrome de fadiga crônica, febre
 reumática, mal de Hamman-Rich, perda de audição sensoneural,
 hemoglobinúria paroxismática, hipogonadismo, ileíte regional, leucopenia,
 mononucleose infecciosa, mielite transversal, mixedema idiopático primário,
 nefrose, oftalmia simpática, orquite granulomatosa, pancreatite, poliradiculite
 10 aguda, pioderma gangrenoso, tireoidite de Quervain, atrofia espênica adquirida,
 timoma não maligna, vitiligo, síndrome de choque tóxico, envenenamento com
 alimentos, condições que envolvem a infiltração de células T, deficiência na
 adesão de leucócitos, reações imunes associadas à hipersensibilidade aguda e
 retardada mediada por citocinas e linfócitos T, doenças que envolvem
 15 diapedese de leucócitos, síndrome por lesões de múltiplos órgãos, doenças
 mediadas por complexo antígeno-anticorpo, doença da membrana base
 antglomerular, neurite alérgica, poliendocrinopatias autoimunes, ooforite,
 mixedema primário, gastrite atrófica autoimune, oftalmia simpática, doenças
 reumáticas, doença do tecido conjuntivo misto, síndrome nefrótica, insulite,
 20 falhas poliendócrinas, síndrome poliglandular autoimune do tipo I,
 hipoparatiroidismo idiopático com início em adultos (AOIH), cardiomiopatia tal
 como cardiomiopatia dilatada, epidermiólise bolhosa adquirida (EBA),
 homocromatose, miocardite, síndrome nefrótica, colangite esclerosante
 primária, sinusite purulenta ou não purulenta, sinusite aguda ou crônica,
 25 sinusite etmóide, frontal, maxilar ou esfenóide, disfunção relativa a eosinófilos
 tal como eosinofilia, eosinofilia por infiltração pulmonar, síndrome de eosinofilia-
 mialgia, síndrome de Löffler, pneumonia eosinofílica crônica, eosinofilia
 pulmonar tropical, aspergilose broncopneumônica, aspergiloma ou granulomas

que contêm eosinófilos, anafilaxia, espondiloartrites soronegativas, doença autoimune poliendócrina, colangite esclerosante, esclerose, episclerose, candidíase mucocutânea crônica, síndrome de Bruton, hipogamaglobulinemia infantil transitória, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectase, disfunções autoimunes associadas a doença de colágeno, reumatismo, doença neurológica, linfadenite, redução da reação da pressão sangüínea, disfunção vascular, lesões dos tecidos, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral e doença que acompanha vascularização, disfunções por hipersensibilidade alérgica, glomerulonefritides, lesões por reperfusão, disfunção por reperfusão isquêmica, lesões por reperfusão de tecidos do miocárdio e outros, traqueobronquite linfomatosa, dermatoses inflamatórias, dermatoses com componentes inflamatórios agudos, falha de múltiplos órgãos, doenças bolhosas, necrose cortical renal, meningite purulenta aguda ou outras disfunções inflamatórias do sistema nervoso central, disfunções inflamatórias oculares e orbitais, síndromes associadas a transfusão de granulócitos, toxicidade induzida por citocinas, narcolepsia, inflamação séria aguda, inflamação intratável crônica, pielite, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, vasculite e endometriose.

“Paciente” no presente é paciente humano.

20 “Paciente de doença autoimune” no presente é paciente que possui ou encontra-se em risco de desenvolver doença autoimune.

“Deslipidação” no presente destina-se a remover lipídio de amostra biológica, tal como soro. Deslipidação é desejável para a remoção de lipídios que podem estar presentes na amostra e podem bloquear ou obstruir coluna de purificação. Deslipidação pode ser atingida por meio de vários métodos que incluem o uso de absorvente (tal como LIPOSORB®; ésteres de sorbitan/ésteres de polioxietileno sorbitan), extração orgânica, filtração, centrifugação e similares.

Por "purificação por afinidade", pretende-se o uso de adsorvente, preferencialmente imobilizado, que se liga seletiva ou preferencialmente a composto ou composição (tal como polipeptídeos que contêm região Fc) para que seja purificado. Exemplos incluem purificação de Proteína A + G; purificação por afinidade de IgG (utilizando, por exemplo, MELON GEL®, da Pierce); anticorpos antiimunoglobulina (utilizados isoladamente ou em combinação com especificidade para um ou mais isotipos; por exemplo, combinação de IgG anti-humano, IgA, IgM e IgE, acoplados para purificação por afinidade específica de cada isotipo); qualquer outro adsorvente com propriedades de ligação de imunoglobulina (tal como PIERCE T-GEL®). O método de purificação por afinidade preferida do presente envolve o uso de purificação por afinidade de Proteína A + G (vide definição abaixo) para purificar isotipos de anticorpos de IgG, IgA, IgM e IgE de amostra biológica. Preferencialmente, a purificação por afinidade do presente purifica polipeptídeos que contêm região Fc de essencialmente todos os isotipos.

"Polipeptídeo que contém região Fc" do presente é polipeptídeo que compreende região Fc. Exemplos destes polipeptídeos incluem anticorpos terapêuticos, imunoadesinas e imunoglobulinas de pacientes (incluindo as imunoglobulinas antidrogas do paciente).

"Adsorvente" no presente é substância ou composição que é capaz de ligar outras substâncias à sua superfície sem nenhuma ligação covalente. Preferencialmente, o adsorvente é imobilizado.

Adsorvente "imobilizado" é aquele que é afixado a fase sólida.

"Fase sólida" indica matriz não aquosa à qual pode ser ligado adsorvente. A fase sólida de interesse no presente geralmente é aquela que compreende superfície de vidro, sílica, agarose ou poliestireno. A fase sólida pode compreender, por exemplo, coluna de purificação ou fase descontínua de partículas discretas.

“Purificação por afinidade de proteína A + G” indica no presente o uso de Proteína A e Proteína G, incluindo suas variantes, fragmentos e/ou fusões, preferencialmente imobilizadas sobre fase sólida, para remover imunoglobulinas ou polipeptídeos que contêm região Fc de amostra. Esta purificação inclui purificação de Proteína A e Proteína G essencialmente simultânea, bem como purificação seqüencial em qualquer ordem (ou seja, Proteína A seguida por Proteína G e vice versa).

“Concentração” no presente indica o aumento da concentração de composto ou composição de interesse. A concentração de imunoglobulinas em amostra pode ser aumentada, por exemplo, utilizando concentrador (tal como concentrador de proteínas Pierce ICON® ou CENTRICON-30®), centrifugação, filtragem etc.

A expressão “atividade biológica” designa função mensurável de agente, tal como anticorpo terapêutico ou imunoadesina no presente. Várias atividades são contempladas e incluem, mas sem limitar-se a citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), apoptose, modulação de canais de íons, inibição do crescimento de células (tais como células que expressem antígeno ao qual o anticorpo terapêutico ou imunoadesina pode ligar-se, etc.

“Teste de atividade biológica” designa teste que avalia a atividade biológica de agente ou composição, tal como anticorpo terapêutico ou imunoadesina.

No presente, “teste com base em células” é bioteste que utiliza células, incluindo linhagens celulares, para avaliar a atividade biológica de agente ou composição, tal como anticorpo terapêutico ou imunoadesina. Preferencialmente, a célula ou linhagem celular utilizada no teste expressa antígeno ao qual liga-se anticorpo terapêutico ou imunoadesina.

A capacidade de amostra biológica (incluindo amostra

previamente tratada ou preparação de imunoglobulina purificada) para “bloquear” atividade biológica de antagonista ou anticorpo designa o bloqueio completo ou parcial daquela atividade.

“Anticorpos neutralizantes” no presente indica anticorpos que não apenas se ligam a antígeno (como anticorpo terapêutico ou imunoadesina) de interesse, mas adicionalmente inibem, até certo ponto, atividade biológica daquele antígeno.

No presente, “teste de anticorpo neutralizante” é teste que avalia a presença de anticorpos neutralizantes em amostra.

“Interferência” no presente designa a presença de composto(s) ou composição(ões) que interfere(m) com a capacidade de reprodução de teste de atividade biológica com base em células, tal como teste de anticorpo neutralizante. A presença de interferência em amostra pode ser confirmada, por exemplo, por meio de teste de soro de pacientes autoimunes nativos da droga da população alvo na qual o bioteste deve ser realizado. Quando o teste demonstrar reações celulares altamente variáveis entre esses indivíduos, pode-se concluir que a interferência de soro está presente em uma ou mais amostras. Preferencialmente, a interferência não é fator reumatóide (RF), imunoglobulina ou droga com a qual paciente tenha sido tratado.

“Célula B” é linfócito que amadurece dentro da medula óssea e inclui célula B nativa, célula B de memória ou célula B efetora (células plasmáticas). A célula B no presente pode ser célula B normal ou não maligna.

“Marcador da superfície de células B” ou “antígeno da superfície de células B” no presente, é antígeno expresso sobre a superfície de células B que pode ser dirigido com antagonista ou anticorpo que se liga a ela. Exemplos de marcadores da superfície de células B incluem os marcadores da superfície de leucócitos de CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b,

CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 e CD86 (para descrições, vide *The Leukocyte Antigen Facts Book*, segunda edição, 1997, ed. Barclay et al, Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nova Iorque). Outros marcadores da superfície de células B incluem RP105, FcRH2, CR2 de células B, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Bt1g, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA e 239287. O marcador da superfície de células B de interesse específico é preferencialmente expresso sobre células B em comparação com outros tecidos não de células B e pode ser expresso sobre células B precursoras e células B maduras. Os marcadores da superfície de células B preferidos no presente são CD20, CD22 e BR3.

O antígeno "CD20" ou "CD20" é fosfoproteína não glicosilada de cerca de 35 kDa encontrada sobre a superfície de mais de 90% das células B de sangue periférico ou órgãos linfóides. CD20 está presente tanto sobre células B normais quanto sobre células B malignas, mas não é expresso em células haste. Outros nomes para CD20 na literatura incluem "antígeno restrito por linfócitos B" e "Bp35". O antígeno de CD20 é descrito, por exemplo, em Clark et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 82: 1766 (1985).

"Antagonista marcador da superfície de células B" é molécula que, mediante ligação a marcador da superfície de células B, destrói ou esgota as células B em mamíferos e/ou interfere com uma ou mais funções de células B, por exemplo, por meio da redução ou prevenção de reação humoral permitida pela célula B. O antagonista é preferencialmente capaz de esgotar células B (ou seja, reduzir os níveis de células B em circulação) em pacientes com ele tratados. Este esgotamento pode ser atingido por meio de vários mecanismos, tais como citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), inibição da proliferação de células B e/ou indução da morte de células B (por exemplo, via apoptose). Os antagonistas incluídos dentro do escopo da presente invenção

incluem anticorpos, peptídeos sintéticos ou de sequência nativa, imunoadesinas e antagonistas de moléculas pequenas que se ligam a marcador da superfície de células B tal como CD20, opcionalmente conjugados ou fundidos a agente citotóxico. O antagonista preferido compreende anticorpo.

5 “Antagonista de anticorpo CD20” no presente é anticorpo que, mediante ligação a CD20 sobre células B, destrói ou esgota as células B em mamíferos e/ou interfere com uma ou mais funções de células B, por exemplo, por meio da redução ou prevenção de reação humoral permitida pela célula B. O antagonista de anticorpo é preferencialmente capaz de esgotar células B (ou seja,
10 reduzir os níveis de células B em circulação) em pacientes com ele tratados. Este esgotamento pode ser atingido por meio de vários mecanismos, tais como citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), inibição da proliferação de células B e/ou indução da morte de células B (por exemplo, via apoptose).

15 Da forma utilizada no presente, “esgotamento de células B” indica redução dos níveis de células B em animais ou seres humanos após o tratamento com anticorpo ou droga, em comparação com o nível antes do tratamento. O esgotamento de células B pode ser parcial ou completo. Os níveis de células B são mensuráveis utilizando métodos bem conhecidos, tais
20 como os descritos em Reff et al, *Blood* 83: 435-445 (1994), ou na Patente Norte-Americana nº 5.736.137 (Anderson et al). Como forma de exemplo, mamífero (tal como primata normal) pode ser tratado com várias dosagens do anticorpo ou imunoadesina e concentrações de células B periféricas podem ser determinadas, por exemplo, por meio de método FACS que conta as células B.

25 Exemplos de anticorpos CD20 incluem: “C2B8”, que agora é denominado “rituximab” (“RITUXAN[®]”) (Patente Norte-Americana nº 5.736.137); o anticorpo murino 2B8 marcado com ítrio [90] denominado “Y2B8” ou “Ibritumomab Tiuxetan” (ZEVALIN[®]) disponível comercialmente por meio da

IDEC Pharmaceuticals, Inc. (Patente Norte-Americana nº 5.736.137; 2B8 depositado na ATCC sob número de acesso HB11388 em 22 de junho de 1993); IgG2a murino "B1", também denominado "Tositumomab", opcionalmente marcado com ^{131}I para gerar o anticorpo " ^{131}I -B1" ou "iodo ^{131}I tositumomab" (BEXXAR®) disponível comercialmente por meio da Corixa (vide também a Patente Norte-Americana nº 5.595.721); anticorpo monoclonal murino "1F5" (Press et al, *Blood* 69 (2): 584-591 (1987) e suas variantes, incluindo 1F5 humanizado ou com "emplastro de estrutura" (WO 2003/002607, Leung, S.; depósito ATCC HB-96450); anticorpo 2H7 murino e 2H7 quimérico (Patente Norte-Americana nº 5.677.180); 2H7 humanizado (WO 2004/056312 (Lowman et al) e conforme descrito abaixo); 2F2 (HuMax-CD20), anticorpo totalmente humano de alta afinidade dirigido à molécula CD20 na membrana celular de células B (Genmab, Dinamarca; vide, por exemplo, Glennie e van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) e Cragg et al, *Blood* 101: 1045-1052 (2003)); WO 2004/035607; US 2004/0167319); os anticorpos monoclonais humanos descritos em WO 2004/035607 e US 2004/0167319 (Teeling et al); em que os anticorpos contêm cadeias de açúcar ligadas por N-glicosídeos complexas ligadas à região Fc descrita em US 2004/0093621 (Shitara et al); anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação de antígenos que se ligam a CD20 (WO 2005/000901, Tedder et al), tais como HB20-3, HB20-4, HB20-25 e MB20-11; moléculas de ligação de CD20, tais como a série AME de anticorpos, tais como anticorpos AME 33 conforme descrito em WO 2004/103404 e US 2005/0025764 (Watkins et al, *Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME*); moléculas de ligação de CD20 tais como as descritas em US 2005/0025764 (Watkins et al); anticorpo A20 ou suas variantes tais como anticorpo A20 humanizado ou quimérico (cA20, hA20, respectivamente) ou IMMU-106 (US 2003/0219433, Immunomedics); anticorpos de ligação de CD20, incluindo Leu-16, 1H4 ou 2B8 esgotados por epítomos, opcionalmente conjugados com IL-2,

como em US 2005/0069545A1 e WO 2005/16969 (Carr et al); anticorpo
 biespecífico que liga CD22 e CD20, tal como hLL2xhA20 (WO 2005/14618,
 Chang et al); anticorpos monoclonais L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 ou NU-B2
 disponíveis por meio da International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et
 5 al, em: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., pág. 440, Oxford University Press
 (1987)); 1H4 (Haisma et al, *Blood* 92: 184 (1998)); conjugado de auristatina E
 anti-CD20 (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope);
 terapia com MAb anti-CD20 (EpiCyte); anticorpo anti-CD20 TRU 015 (Trubion).
 Os anticorpos CD20 preferidos no presente são anticorpos CD20 quiméricos,
 10 humanizados ou humanos, de maior preferência rituximab, 2H7 humanizado,
 anticorpo CD20 humano 2F2 (Hu-Max-CD20) (Genmab) e anticorpo A20
 humanizado ou IMMUN-106 (Immunomedics).

Os termos "rituximab" ou "RITUXAN®" no presente indicam o
 anticorpo monoclonal humano/murino quimérico geneticamente elaborado dirigido
 15 contra o antígeno CD20 e denominado "C2B8" na Patente Norte-Americana nº
 5.736.137, incluindo seus fragmentos que retêm a capacidade de ligar CD20.

Puramente para os propósitos do presente e a menos que
 indicado em contrário, anticorpo "2H7 humanizado" é variante humanizada de
 anticorpo 2H7 murino, em que o anticorpo é eficaz para reduzir células B em
 20 circulação *in vivo*.

Em uma realização, o anticorpo 2H7 humanizado compreende
 uma, duas, três, quatro, cinco ou seis das seqüências de CDR a seguir:

seqüência de CDR L1 RASSSVSYXH em que X é M ou L (SEQ
 ID Nº 21), tal como SEQ ID Nº 4 (Fig. 1A),

25 seqüência de CDR L2 de SEQ ID Nº 5 (Fig. 1A),

seqüência de CDR L3 QQW XFNPPT em que X é S ou A (SEQ ID
 Nº 22), tal como SEQ ID Nº 6 (Fig. 1A),

seqüência de CDR H1 de SEQ ID Nº 10 (Fig. 1B),

seqüência de CDR H2 de AIYPGNGXTSYNQKFKG em que X é D ou A (SEQ ID N° 23), tal como SEQ ID N° 11 (Fig. 1B) e

seqüência de CDR H3 de VVYYSXXYWYFDV em que o X na posição 6 é N, A, Y, W ou D e o X na posição 7 é S ou R (SEQ ID N° 24), tal como SEQ ID N° 12 (Fig. 1B).

As seqüências de CDR acima geralmente estão presentes em seqüências de estrutura leve variável e pesada variável humanas, tais como substancialmente os resíduos de FR de consenso humano de subgrupo I capa de cadeia leve humana (V_LI) e substancialmente os resíduos de FR de consenso humano de subgrupo de cadeia pesada humana III (V_HIII). Vid e também WO 2004/056312 (Lowman et al).

A região pesada variável pode ser ligada a região constante da cadeia de IgG humana, em que a região pode ser, por exemplo, IgG1 ou IgG3, que inclui regiões constantes variáveis e de seqüência nativa.

Em realização preferida, esse anticorpo compreende a seqüência de domínio pesado variável de SEQ ID N° 8 (v16, conforme exibido na Fig. 1B), que opcionalmente também compreende a seqüência de domínio leve variável de SEQ ID N° 2 (v16, conforme exibido na Fig. 1A), que compreende opcionalmente uma ou mais substituições de aminoácidos nas posições 56, 100 e/ou 100a, tais como D56A, N100A, N100Y e/ou S100aR no domínio pesado variável e uma ou mais substituições de aminoácidos nas posições 32 e/ou 92, tais como M32L e/ou S92A, no domínio leve variável. Preferencialmente, o anticorpo é anticorpo intacto que compreende as seqüências de aminoácidos de cadeia leve de SEQ ID N° 13 ou 15 e seqüências de aminoácidos de cadeia pesada de SEQ ID N° 14, 16, 17 ou 20.

Anticorpo 2H7 humanizado preferido é ocrelizumab (Genentech).

O anticorpo do presente pode compreender adicionalmente pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc que aumenta a atividade

de ADCC, tal como aquele em que as substituições de aminoácidos estão nas posições 298, 333 e 334, de maior preferência S298A, E333A e K334A, utilizando numeração Eu de resíduos de cadeia pesada. Vide também a Patente Norte-Americana nº 6.737.056 B1, Presta.

5 Qualquer destes anticorpos pode compreender pelo menos uma substituição na região Fc que aumenta a ligação de FcRn ou meia vida em soro, tal como substituição na posição 434 de cadeia pesada, tal como N434W. Vide também a Patente Norte-Americana nº 6.737.056 B1, Presta.

10 Qualquer desses anticorpos pode ainda compreender pelo menos uma substituição de aminoácido na região Fc que aumenta a atividade de CDC, compreendendo, por exemplo, pelo menos uma substituição na posição 326, preferencialmente K326A ou K326W. Vide também a Patente Norte-Americana nº 6.528.624 B1 (Idusogie et al).

15 Algumas variantes 2H7 humanizadas preferidas são aquelas que compreendem o domínio leve variável de SEQ ID Nº 2 e o domínio pesado variável de SEQ ID Nº 8, que incluem aqueles com ou sem substituições em região Fc (quando presente) e os que compreendem domínio pesado variável com alteração N100A; ou D56A e N100A; ou D56A, N100Y e S100aR; em SEQ ID Nº 8 e domínio leve variável com alteração M32L; ou S92A; ou M32L e
20 S92A; em SEQ ID Nº 2.

M34 no domínio pesado variável de 2H7.v16 foi identificado como fonte potencial de estabilidade de anticorpos e é outro candidato potencial para substituição.

25 Em resumo de algumas das diversas realizações preferidas da presente invenção, a região variável de variantes com base em 2H7.v16 compreende as seqüências de aminoácidos de v16, exceto nas posições de substituições de aminoácidos que são indicadas na Tabela 1 abaixo. A menos que indicado em contrário, as variantes de 2H7 conterão a mesma cadeia leve de v16.

TABELA 1**EXEMPLOS DE VARIANTES DE ANTICORPO 2H7 HUMANIZADO**

2H7 Versão	Cadeia pesada (V_H) mudanças	Cadeia leve (V_L) mudanças	Mudanças de Fc
16 para referência			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

2H7 humanizado preferido compreende a seqüência de domínio leve variável 2H7.v16:

- 5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGKVEIK
R (SEQ ID Nº 2);

e a seqüência de domínio pesado variável 2H7.v16:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI
YPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYS
NSYWYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID N° 8).

5 Quando o anticorpo 2H7.v16 humanizado for anticorpo intacto, ele
pode compreender a seqüência de aminoácidos de cadeia leve:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
10 QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID N° 13);

e a seqüência de aminoácidos de cadeia pesada de SEQ ID N° 14 ou:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI
YPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYS
15 NSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
20 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N° 17).

Outro anticorpo 2H7 humanizado preferido compreende
seqüência de domínio leve variável 2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
25 ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIK
R (SEQ ID N° 18)

e a seqüência de domínio pesado variável 2H7.v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI

YPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYS
YRYWYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID N° 19).

Quando o anticorpo 2H7.v511 humanizado for anticorpo intacto, ele pode compreender a seqüência de aminoácidos de cadeia leve:

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID N° 15)

10 e a seqüência de aminoácidos de cadeia pesada de SEQ ID N° 16 ou:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI
YPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYS
YRYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
15 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID N° 20).

20 Para os propósitos do presente, “imunoterapia” designará método de tratamento de mamífero (preferencialmente paciente humano) com anticorpo, em que o anticorpo pode ser anticorpo não conjugado ou “bruto”, ou o anticorpo pode ser conjugado ou fundido com agente(s) ou molécula(s) heteróloga(s), tal(is) como um ou mais agentes citotóxicos, de forma a gerar “imunocombinado”.

25 Da forma utilizada no presente, “anticorpo terapêutico” é anticorpo que é eficaz no tratamento de doença ou disfunção (preferencialmente doença autoimune) em mamíferos com a doença ou disfunção ou a elas pré-dispostos. Exemplos de anticorpos terapêuticos incluem anticorpos HER2 que incluem

trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 4285-4289 (1992), Patente Norte-Americana nº 5.725.856) e pertuzumab (OMNITARG®) (WO 01/00245); anticorpos CD20 (vide abaixo); anticorpos IL-8 (St. John et al, *Chest*, 103: 932 (1993) e Patente Internacional nº WO 95/23865); anticorpos VEGF ou receptores de VEGF que incluem anticorpos VEGF humanizados e/ou amadurecidos por afinidade, tais como o anticorpo VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®) e ranibizumab (LUCENTIS®) (Kim et al, *Growth Factors*, 7: 53-64 (7: 53-64 (1992)), Patentes Internacionais nº WO 96/30046 e WO 98/45331, publicadas em quinze de outubro de 1998); anticorpos PSCA (WO 01/40309); anticorpos CD11a que incluem efalizumab (RAPTIVA®) (Patente Norte-Americana nº 5.622.700, WO 98/23761, Steppe et al, *Transplant Intl.* 4: 3-7 (1991) e Hourmant et al, *Transplantation* 58: 377-380 (1994)); anticorpos que ligam IgE incluindo omalizumab (XOLAIR®) (Presta et al, *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993) e Patente Internacional nº WO 95/19181; Patente Norte-Americana nº 5.714.338, emitida em três de fevereiro de 1998, ou Patente Norte-Americana nº 5.091.313, emitida em 25 de fevereiro de 1992, WO 93/04173, publicada em quatro de março de 1993, ou Pedido Internacional nº PCT/US 98/13410, depositado em trinta de junho de 1998, Patente Norte-Americana nº 5.714.338); anticorpos CD18 (Patente Norte-Americana nº 5.622.700, emitida em 22 de abril de 1997, ou como em WO 97/26912, publicada em 31 de julho de 1997); anticorpos receptores de Apo-2 (WO 98/51793, publicada em 19 de novembro de 1998); anticorpos de Fator de Tecido (TF) (Patente Européia nº 0.420.937 B1, concedida em nove de novembro de 1994); anticorpos α_4 - α_7 integrina (WO 98/06248, publicada em 19 de fevereiro de 1998); anticorpos EGFR (tais como anticorpo 225 quimerizado ou humanizado, cetuximab, ERBUTIX® como em WO 96/40210, publicada em 19 de dezembro de 1996); anticorpos CD3 tais como OKT3 (Patente Norte-Americana nº 4.515.893, emitida em sete de maio

de 1985); anticorpos CD25 ou Tac tais como CHI-621 (SIMULECT®) e ZENAPAX® (vide Patente Norte-Americana nº 5.693.762, emitida em dois de dezembro de 1997); anticorpos CD4, tais como o anticorpo cM-7412 (Choy et al, *Arthritis Rheum.* 39 (1): 52-56 (1996); anticorpos CD52, tais como

5 CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann et al, *Nature* 332: 323-337 (1988)); anticorpos receptores de Fc tais como o anticorpo M22 dirigido contra FcγRI como em Graziano et al, *J. Immunol.* 155 (10): 4996-5002 (1995); anticorpos antígenos carcinoembrionários (CEA), tais como hMN-14 (Sharkey et al, *Cancer Res.* 55 (23 Supl.): 5935s-5945s (1995)); anticorpos dirigidos contra células

10 epiteliais mamárias que incluem huBrE-3, huMc 3 e CHL6 (Ceriani et al, *Cancer Res.* 55 (23): 5852s-5856s (1995); e Richman et al, *Cancer Res.* 55 (23 Supl.): 5916s-5920s (1995)); anticorpos que se ligam a células de carcinoma do cólon tais como C242 (Litton et al, *Eur. J. Immunol.* 26 (1): 1-9 (1996)); anticorpos CD38, tais como AT 13/5 (Ellis et al, *J. Immunol.* 155 (2): 925-937 (1995));

15 anticorpos CD33, tais como Hu M195 (Jurcic et al, *Cancer Res.* 55 (23 Supl.): 5908s-5910s (1995)) e CMA-676 ou CDP771; anticorpos EpCAM, tais como 17-1A (PANOREX®); anticorpos GpIIb/IIIa, tais como abciximab ou c7E3 Fab (REOPRO®); anticorpos RSV, tais como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticorpos CMV, tais como PROTOVIR®; anticorpos HIV, tais como PRO542; anticorpos

20 da hepatite, tais como o anticorpo Hep B OSTAVIR®; anticorpo CA 125 OvaRex; anticorpo de epítipo GD3 idiotípico BEC2; anticorpo v̄v33 (tal como VITAXIN®; Medimmune); anticorpo de carcinoma das células renais humanas, tais como ch-G250; ING-1; anticorpo anti-17-1A humano (3622W94); anticorpo anti-tumor colo-retal humano (A33); anticorpo anti-melanoma humano R24

25 dirigido contra GD3 gangliosídeo; anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); anticorpo de antígeno de leucócitos humanos (HLA) tal como Smart ID10 e o anticorpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticorpo CD37, tal como TRU 016 (Trubion); anticorpo IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk);

anticorpo anti-células B (Impheron); MAb direcionador de células B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticorpo Lym-1, tal como Lym-1Y-90 (USC) ou anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticorpo BAFF (tal como WO 03/33658); anticorpo receptor de BAFF (tal como WO 02/24909); anticorpo BR3; anticorpo Blys, tal como belimumab; LYMPHOSTAT-B®; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticorpo receptor de IL-6, tal como atlizumab (ACTEMRA®; Chugai/Roche); anticorpo IL-15, tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticorpo receptor de quemoquina, tal como anticorpo CCR2 (por exemplo, MLN1202; Millienneum); anticorpo anti-complemento, tal como anticorpo C5 (por exemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulação oral de imunoglobulina humana (tal como IgPO; Protein Therapeutics); anticorpo IL-12, tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818; BMS); anticorpos CD40, incluindo S2C6 e suas variantes humanizadas (WO 00/75348) e TNX 100 (Chiron/Tanox); anticorpos TNF- α , incluindo cA2 ou infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA®); fragmento de anticorpo TNF- γ pegilado, tal como CDP-870 (Celltech), D2E7 (Knoll), anticorpo policlonal anti-TNF- α (por exemplo, PassTNF; Verigen); anticorpos CD22, tais como LL2 ou epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluindo epratuzumab Y-90 e epratuzumab I-131, anticorpo CD22 da Abiogen (Abiogen, Itália), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) e LymphoScan Tc99 (Immunomedics). Preferencialmente, o anticorpo terapêutico do presente é anticorpo intacto bruto útil no tratamento de doenças autoimunes, tais como RA e/ou SLE.

Da forma utilizada no presente, o termo “imunoadesina” designa moléculas que combinam a especificidade de ligação de proteína heteróloga

(“adesina”) com as funções efetoras de domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem fusão de seqüência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada, que é diferente do sítio de ligação e reconhecimento de antígenos de anticorpo (ou seja, é “heteróloga”) e seqüência de domínio constante de imunoglobulina (tais como seqüências CH2 e/ou CH3 de IgG). Exemplos de seqüências de adesina incluem seqüências de aminoácidos contíguas que compreendem uma porção de receptor (no presente, “domínio de ligação de ligante”) ou ligante (no presente, “domínio de ligação de receptor”) que se liga a proteína de interesse.

Seqüências de adesina também incluem seqüências que se ligam a proteína de interesse, mas não são seqüências de ligantes ou receptores (tais como seqüências de adesina em corpos de peptídeos). Essas seqüências de polipeptídeos podem ser selecionadas ou identificadas por meio de diversos métodos, que incluem métodos de exibição de fagos e métodos de ordenamento de alto rendimento.

A expressão “domínio de ligação de ligante”, da forma utilizada no presente, designa qualquer receptor da superfície celular nativo ou qualquer região ou seu derivado que retenha pelo menos a capacidade de ligação de ligante qualitativo de receptor nativo correspondente. Em realização específica, o receptor é de polipeptídeo de superfície celular que contém domínio extracelular que é homólogo a membro da superfamília genética da imunoglobulina. Outros receptores que não são membros da superfamília genética da imunoglobulina mas que, mesmo assim, são especificamente cobertos pela presente definição, são receptores para citocinas, particularmente receptores com atividade de tirosino quinase (tirosino quinases receptoras), membros das superfamílias de receptores de fator de crescimento dos nervos e hematopoietina e moléculas de adesão celular, tais como (E-, L- e P-) seletinas.

A expressão “domínio de ligação de receptor” é utilizada para

designar qualquer ligante nativo para receptor, incluindo moléculas de adesão celular, ou qualquer região ou derivado desse ligante nativo que retenha pelo menos a capacidade de ligação de receptor qualitativo de ligante nativo correspondente. Esta definição, entre outras, inclui especificamente seqüências de ligação de ligantes para os receptores mencionados acima.

“Quimera de anticorpo e imunoadesina” compreende molécula que combina pelo menos um domínio de ligação de anticorpo (conforme definido no presente) com pelo menos uma imunoadesina (conforme definido no presente pedido). Exemplos de quimeras de anticorpos e imunoadesina são as quimeras CD4-IgG biespecíficas descritas em Berg et al, *PNAS (USA)* 88: 4723-4727 (1991) e Chamow et al, *J. Immunol.* 153: 4268 (1994).

“Tratamento” de paciente no presente designa tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Os necessitados de tratamento incluem os que já detêm a doença, bem como aqueles em que a doença deve ser evitada. Desta forma, o paciente pode haver sido diagnosticado como tendo a doença ou pode ser predisposto ou suscetível à doença. O termo “tratamento”, “tratar” ou “em tratamento”, da forma utilizada no presente, inclui tratamento preventivo (tal como profilático), paliativo e curativo.

A expressão “quantidade eficaz” designa quantidade de droga (tal como anticorpo ou imunoadesina) que é eficaz para prevenir, melhorar ou tratar da doença. Essa quantidade eficaz geralmente resultará em melhoria dos sinais ou sintomas da doença.

A expressão “agente imunossupressivo”, da forma utilizada no presente para terapia adjunta, designa substâncias que agem para suprimir ou mascarar o sistema imunológico do paciente sendo tratado no presente. Isso incluiria substâncias que suprimem a produção de citocinas, regulam para baixo ou suprimem a expressão de autoantígenos ou mascaram os antígenos de MHC. Exemplos desses agentes incluem pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-

substituídas (vide a Patente Norte-Americana nº 4.665.077); drogas antiinflamatórias não esteroidais (NSAIDs); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticóides tais como cortisol ou aldosterona, agentes antiinflamatórios tais como inibidor da ciclooxigenase, inibidor da 5-lipoxigenase ou antagonista
5 receptor de leucotrienos; antagonistas de purina, tais como azatioprina ou micofenolato mofetil (MMF); agentes alquilantes, tais como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldeído (que mascara os antígenos de MHC, conforme descrito na Patente Norte-Americana nº 4.120.649); anticorpos anti-idiotípicos para antígenos de MHC e fragmentos de MHC; ciclosporina; 6-
10 mercaptopurina; esteróides, tais como corticoesteróides, glucocorticoesteróides ou análogos de glucocorticóides, como prednisona, metilprednisolona, incluindo metilprednisolona succinato de sódio SOLU-MEDROL® e dexametasona; inibidores da di-hidrofolato reductase tais como metotrexato (oral ou subcutâneo); agentes anti-malária, tais como cloroquina e hidroxicloroquina;
15 sulfasalazina; leflunomida; citocina ou anticorpos ou antagonistas receptores de citocina, incluindo anticorpos anti-interferona-alfa, beta ou gama; anticorpos anti-fator de necrose tumoral (TNF) alfa (infiximab (REMICADE®) ou adalimumab); imunoadesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticorpos anti-TNF-beta, anticorpos anti-interleucina-2 (IL-2) e anticorpos anti-receptor IL-2; e
20 antagonistas e anticorpos receptores anti-interleucina-6 (IL-6); anticorpos anti-LFA-1, incluindo anticorpos anti-CD11a e anti-CD18; anticorpos anti-L3T4; globulina anti-linfócitos heterólogos; anticorpos pan-T, preferencialmente anticorpos anti-CD3 ou anti-CD4/CD4a; peptídeos solúveis que contêm domínio de ligação de LFA-3 (WO 90/08187, publicada em 26 de julho de
25 1990); estreptoquinase; fator beta de crescimento de transformação (TGF-beta); estreptodornase; RNA ou DNA do hospedeiro; FK506; RS-61443; clorambucil; desoxiespergualin; rapamicin; receptor de células T (Cohen et al, Patente Norte-Americana nº 5.114.721); fragmentos receptores de células T

(Offner et al, *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989); e WO 91/01133; antagonistas de BAFF, tais como anticorpos BAFF ou BR3 ou imunoadesinas e antagonistas de zTNF4 (para análise, vide Mackay e Mackay, *Trends Immunol.*, 23: 113-5 (2002) e vide também a
 5 definição abaixo); agentes biológicos que interferem com sinais auxiliares de células T, tais como receptor anti-CD40 ou ligante anti-CD40 (CD154), incluindo anticorpos bloqueadores para ligante CD40-CD40 (por exemplo, Durie et al, *Science*, 261: 1328-30 (1993); Mohan et al, *J. Immunol.*, 154: 1470-80 (1995)) e CTLA4-Ig (Finck et al, *Science*, 265: 1225-7 (1994)); e anticorpos
 10 receptores de células T (EP 340.109), tais como T10B9.

Da forma utilizada no presente, "antagonista de BAFF" designa geralmente qualquer composto que iniba diretamente a atividade biológica de BAFF. Molécula inibe diretamente a atividade biológica de BAFF por meio de interação com polipeptídeo de BAFF, gene BAFF, transcripto de BAFF ou
 15 receptor de BAFF. Antagonista de BAFF pode, por exemplo, ligar-se e neutralizar a atividade de BAFF; reduzir os níveis de expressão de BAFF; afetar a estabilidade de BAFF; afetar a divisão proteolítica da forma ligada por membrana de BAFF na forma solúvel; interferir com a ligação de BAFF a um ou mais receptores; ou pode interferir com a sinalização intracelular de um ou
 20 mais receptores de BAFF. Antagonistas de BAFF podem ser proteináceos (tais como anticorpos, proteínas de fusão de receptores, peptídeos, corpos de peptídeos, mutantes de BAFF negativos dominantes) ou moléculas não proteináceas (tais como moléculas orgânicas pequenas (menos de cerca de 500 Da)), incluindo siRNA e aptâmeros etc. Métodos de determinação da
 25 atividade biológica neutralizadora de antagonistas de BAFF incluem os conhecidos e descritos na técnica. Exemplos de antagonistas de BAFF incluem polipeptídeos que compreendem porção de ligação de BAFF de receptor de BAFF ou sua variante de ligação de BAFF (tais como WO 01/12812, WO

02/24909, WO 00/40716, WO 03/024991), anticorpos anti-BAFF (tais como WO 03/33658), corpo de peptídeo de ligação de BAFF (tal como WO 02/092620), anticorpos anti-BAFF-R (tais como WO 02/24909) e peptídeos de ligação de BAFF (tais como WO 02/16412). Segundo realização, o antagonista de BAFF é
 5 selecionado a partir do grupo que consiste de BCMA-Fc (tal como WO 01/12812), BAFF-R-Fc (tal como WO 02/24909), TACI-Ig (tal como WO 00/40716), anticorpo anti-BAFF (tal como WO 03/33658), anticorpo anti-BAFF-R (tal como WO 02/24909), corpos de peptídeos de ligação de BAFF (tais como WO 02/092620), BAFF negativo dominante (tal como WO 04/081043).
 10 Segundo realização adicional, anticorpos anti-BAFF e anticorpos receptores anti-BAFF são humanos, humanizados, quimerizados ou aprimorados de outra forma para tratamento em seres humanos.

A expressão “agente citotóxico”, da forma utilizada no presente, indica substância que inibe ou evita o funcionamento das células e/ou causa
 15 destruição das células. A expressão destina-se a incluir isótopos radioativos (tais como At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos e toxinas tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos.

20 “Agente quimioterápico” é composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquila, tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas,
 25 incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona); delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; camptotecin (incluindo

o análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecin, escopolectin e 9-aminocamptotecin); briostatina; calistatin; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesin, carzelesin e bizelesin); podofilotoxina; ácido podofilínico;

5 teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatin; duocarmicin (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobin; pancratistatin; sarcodictin; espongistatin; mostardas de nitrogênio tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato óxido de mecloretamina, melfalan,

10 novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosuréis tais como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 1I e caliqueamicina ômega 1I (vide, por exemplo, Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33:

15 183-186 (1994); dinemicin, incluindo dinemicin A; esperamicin; bem como neocarzinostatin cromóforo e cromóforos antibióticos de enediina cromoproteína relacionados), aclacinomisin, actinomycin, autramicin, azaserina, bleomicinas, cactinomycin, carabycin, carminomicin, carzinofilin, cromomicinas, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-

20 norleucina, doxorubicin (incluindo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicin, cianomorfolino-doxorubicin, 2-pirrolino-doxorubicin, injeção de lipossomo doxorubicin HCl (DOXIL®), doxorubicin lipossômico TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicin lipossômico pegilado (CAELYX®) e desoxidoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcelomicin, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido

25 micofenólico, nogalamycin, olivomicinas, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamicin, rodorubicin, estreptonigrin, estreptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; antimetabólitos, tais como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), epotilona e 5-

fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamido glicosídeo; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; etoglucid; nitrato de gálio;

10 hidroxauréia; lentinan; lonidainina; maitansinóides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostátin; fenamet; pirarubicin; losoxantrona; 2-etil hidrazida; procarbazona; complexo de polissacarídeo PSK® (JHS Natural Products, Eugene OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2, 2', 2"-

15 trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A e anguidina); uretano; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxóides, tais como paclitaxel (TAXOL®), formulação de nanopartículas elaboradas com albumina de paclitaxel (ABRAXANE®) e docetaxel (TAXOTERE®); clorambucil; 6-

20 tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina, tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vincas, que evitam que a polimerização de tubulin forme microtúbulos, incluindo vinblastina (VELBAN®); vincristina (ONCOVIN®); vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) e vinorelbina (NAVELBINE®); etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovin; novantrona;

25 edatrexato; daunomicin; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides tais como ácido retinóico, incluindo bexaroteno (TARGRETIN®); bifosfonatos, tais como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido

zoledrônico/zoledronato (ZOMETA(R)), alendronato (FOSAMAX(R)), pamidronato (AREDIA(R)), tiludronato (SKELID(R)) ou risedronato (ACTONEL(R)), troxacitabina (análogo de 1,3-dioxolano nucleosídeo citosina);[®]igonucleotídeos sem sentido, particularmente os que inibem a expressão de genes em processos de sinalização implicados na proliferação de células aberrantes, tais como PKC-alfa, Raf, H-Ras e receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R); ;vacinas, tais como vacina THERATOPE(R) e vacinas de terapia genética, tais como vacina ALLOVECTIN(R), vacina LEUVECTIN[®] e vacina VAXID[®]; inibidor de topoisomerase 1 (tal como LURTOTECAN[®]), rmRH (tal como ABARELIX[®]); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosine, inibidor de COX-2 (tal como celecoxib ou etoricoxib), inibidor de proteossomo (tal como PS341); bortezomib (VELCADE[®]); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódio (GENASENSE[®]); pixantrona; e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima, tais como CHOP, abreviação de terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicin, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, abreviação de regime de tratamento com oxaliplatin (ELOXATIN[®]) combinada com 5-FU e leucovovin.

No presente, agentes quimioterápicos incluem “agentes anti-hormonais” ou “terapêuticos endócrinos”, que agem para regular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos de hormônios que podem promover o crescimento do câncer. Eles próprios podem ser hormônios, incluindo, mas sem limitar-se a: antiestrógenos com perfil agonista/antagonista misturado, incluindo tamoxifen (NOVALDEX[®]), 4-hydroxytamoxifen, toremifeno (FARESTON[®]), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA[®]), trioxifeno, queoxifeno e moduladores receptores de estrógenos seletivos (SERMs), tais como SERM3; antiestrógenos puros sem propriedades agonistas, tais como fulvestrante

(FASLODEX®) e EM800 (esses agentes podem bloquear a dimerização de receptores de estrógenos (ER), inibir a ligação de DNA, aumentar o rendimento de ER e/ou suprimir os níveis de ER); inibidores da aromatase, incluindo inibidores da aromatase esteroidais, tais como formestano e exemestano (AROMASIN®), e inibidores da aromatase não esteroidais, tais como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) e aminoglutetimida, e outros inibidores da aromatase incluem vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol e 4 (5)-imidazóis; agonistas de hormônios que liberam hormônios luteinizantes, incluindo leuprolida (LUPRON® e ELIGARD®), goserelin, buserelin e triptorelin; esteróides sexuais, incluindo progestinas tais como acetato de megestrol e acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tais como dietilestilbestrol e premarin e andrógenos/retinóides tais como fluoximesterona, todo ácido transretiônico e feretina; onapristona; antiprogesteronas; diminuidores de receptores estrógenos (ERDs); antiandrógenos tais como flutamida, nilutamida e bicalutamida; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de quaisquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima.

Da forma utilizada no presente, a expressão “inibidor de EGFR” designa compostos que se ligam ou interagem de outra forma diretamente com EGFR e evitam ou reduzem a sua atividade sinalizadora, e é alternativamente denominado “antagonista de EGFR”. Exemplos desses agentes incluem anticorpos e moléculas pequenas que se ligam a EGFR. Exemplos de anticorpos que se ligam a EGFR incluem MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB 8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (vide Patente Norte-Americana n° 4.943.533, Mendelsohn et al) e suas variantes, tais como 225 quimerizado (C225 ou Cetuximab; ERBUTIX®) e 225 humano remodelado (H225) (vide WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, anticorpo dirigido a EGFR totalmente humano (Imclone); anticorpos que

ligam EGFR mutante do tipo II (Patente Norte-Americana nº 5.212.290); anticorpos quiméricos e humanizados que ligam EGFR conforme descrito na Patente Norte-Americana nº 5.891.996; e anticorpos humanos que ligam EGFR, tais como ABX-EGF ou Panitumumab (vide WO 98/50433, 5 Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al, *Eur. J. Cancer* 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), anticorpo EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compete com EGF e TGF-alfa pela ligação de EGFR (EMD/Merck); anticorpo EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticorpos totalmente humanos conhecidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 e E7.6.3 10 e descritos em US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc.); e mAb 806 ou mAb 806 humanizado (Johns et al, *J. Biol. Chem.* 279 (29): 30375-30384 (2004)). O anticorpo anti-EGFR pode ser conjugado com agente citotóxico, de forma a gerar imunoc conjugado (vide, por exemplo, EP 659.439 A2, Merck Patent GmbH). Os antagonistas de EGFR incluem moléculas pequenas tais como os 15 compostos descritos nas Patentes Norte-Americanas nº 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008 e 5.747.498, bem como as publicações PCT a seguir: WO 98/14451, WO 98/50038, WO 99/09016 e 20 WO99/24037. Antagonistas de EGFR de moléculas pequenas específicos incluem OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, dicloridrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propóxi]-6-quinazolinil]-, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metóxi-6-(3- 25 morfolinopropóxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidino-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-

fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etóxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Sugen); AG1571 (SU 5271; Sugem); inibidores
 5 de tirosino quinase EGFR/HER2 duplos, tais como lapatinib (GW 572016 ou N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metóxi]fenil]6[5[[[2metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; Glaxo-SmithKline).

“Inibidor da tirosino quinase” é molécula que inibe a atividade de tirosino quinase de tirosino quinase tal como receptor de HER. Exemplos
 10 desses inibidores incluem as drogas dirigidas a EGFR observadas no parágrafo anterior; inibidor de tirosino quinase de HER2 de moléculas pequenas, tal como TAK165 disponível por meio da Takeda; CP-724.714, inibidor seletivo oral da tirosino quinase receptora de ErbB2 (Pfizer e OSI); inibidores de HER duplos tais como EKB-569 (disponível por meio da Wyeth) que liga preferencialmente
 15 EGFR mas inibe células que sobreexpressam HER2 e EGFR; lapatinib (GW572016; disponível por meio da Glaxo-SmithKline), inibidor de tirosino quinase HER2 e EGFR oral; PKI-166 (disponível por meio da Novartis); inibidores pan-HER tais como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inibidores de Raf-1 tais como agente sem sentido ISIS-5132 disponível por meio da ISIS
 20 Pharmaceuticals, que inibe a sinalização de Raf-1; inibidores de TK não dirigidos por HER tais como mesilato de Imatinib (GLEEVAC®) disponível por meio da Glaxo; inibidor de quinase I regulado extracelular MAPK CI-1040 (disponível por meio da Pharmacia); quinazolininas, tais como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas;
 25 pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contêm porções nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lamber); moléculas sem sentido (tais como as

que se ligam a ácido nucleico codificador de HER); quinoxalinas (Patente Norte-Americana nº 5.804.396); trifostinas (Patente Norte-Americana nº 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inibidores pan-HER, tais como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; 5 Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); ou conforme descrito em qualquer das publicações de patentes a seguir: Patente Norte-Americana nº 5.804.396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 10 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca); e WO 96/33980 (Zeneca).

“Agente antiangiogênico” designa composto que bloqueia ou interfere, até certo ponto, no desenvolvimento de vasos sanguíneos. O fator 15 antiangiogênico pode ser, por exemplo, molécula pequena ou anticorpo que se liga a fator de crescimento ou receptor de fator de crescimento envolvido na promoção da angiogênese. O fator anti-angiogênico preferido do presente é anticorpo que se liga a Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) ou seu receptor, tal como bevacizumab (AVASTIN®) ou ranibizumab 20 (LUCENTIS®), ou anticorpo $\forall v\exists 3$, tal como VITAXIN® (Medimmune).

O termo “citocina” é termo genérico para proteínas liberadas por uma população celular que agem sobre outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos dessas citocinas são linfoquinas, monoquinas; interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, 25 IL-11, IL-12, IL-15, incluindo PROLEUKIN® rIL-2 e IL-4 humano e mutantes de IL-4 humano, tais como mutante que contém mutação na região de IL-4 que está envolvida na ligação a IL-2R gama, tal como Arg 21 é alterado para resíduo de Glu; fator de necrose tumoral tal como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores de

polipeptídeos que incluem LIF e ligante de kits (KL). Da forma utilizada no presente, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de seqüências nativas, que incluem entidades de moléculas pequenas produzidas sinteticamente e seus sais e derivados farmaceuticamente aceitáveis.

O termo "hormônio" designa hormônios de polipeptídeos, que geralmente são secretados por órgãos glandulares com dutos. Incluem-se entre os hormônios, por exemplo, hormônio do crescimento, tal como hormônio do crescimento humano, hormônio do crescimento humano N-metionila e hormônio do crescimento bovino; hormônio paratireóide; tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, estradiol, terapia de substituição de hormônios; andrógenos, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano ou testolactona; pró-relaxina; hormônios de glicoproteínas tais como hormônio estimulante dos folículos (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH) e hormônio luteinizante (LH); prolactina, lactogênio da placenta, peptídeo associado a gonadotropina de camundongos, hormônio liberador de gonadotropina; inibina; activina; substância inibidora mulleriana e trombopoietina. Da forma utilizada no presente, o termo hormônio inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos do hormônio de seqüência nativa, que incluem entidades de moléculas pequenas produzidas sinteticamente e seus sais e derivados farmaceuticamente aceitáveis.

A expressão "fator de crescimento" designa proteínas que promovem o crescimento e incluem, por exemplo, fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblastos; fator de crescimento endotelial vascular; fatores de crescimento dos nervos, tais como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas; fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF- α e TGF- β ; fator de crescimento similar a insulina I e II;

eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferonas, tais como interferona α , β e γ ; e fatores estimulantes de colônias (CSFs), tais como macrófago-CSF (M-CSF), granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF) e granulócito-CSF (G-CSF). Da forma utilizada no presente, a expressão fator de crescimento inclui

5 proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos do fator de crescimento de seqüência nativa, que incluem entidades de moléculas pequenas produzidas sinteticamente e seus sais e derivados farmacêuticamente aceitáveis.

O termo "integrina" designa proteína receptora que permite que

10 células se unam e reajam à matriz extracelular e está envolvido em uma série de funções celulares tais como cura de feridas, diferenciação de células, abrigo de células de tumores e apoptose. Elas são parte de grande família de receptores da adesão celular que estão envolvidos em interações entre células e entre célula e matriz extracelular. Integrinas funcionais

15 consistem de duas subunidades de glicoproteína transmembranas, denominadas alfa e beta, que são ligadas de forma não covalente. Todas as subunidades alfa compartilham alguma homologia entre si, bem como as subunidades beta. Os receptores sempre contêm uma cadeia alfa e uma cadeia beta. Exemplos incluem alfa6beta1, alfa3beta1, alfa7beta1, LFA-1

20 etc. Da forma utilizada no presente, o termo "integrina" inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos da integrina de seqüência nativa, que incluem entidades de moléculas pequenas produzidas sinteticamente e seus sais e derivados farmacêuticamente aceitáveis.

25 Para os propósitos do presente, "fator de necrose tumoral alfa" (TNF-alfa) designa molécula de TNF-alfa humana que compreende a seqüência de aminoácidos descrita em Pennica et al, *Nature*, 312: 721 (1984) ou Aggarwal et al, *JBC*, 260: 2345 (1985).

"Inibidor de TNF-alfa" no presente é agente que inibe, até certo ponto, função biológica de TNF-alfa, geralmente por meio da ligação a TNF-alfa e neutralização da sua atividade. Exemplos de inibidores de TNF contemplados especificamente no presente são etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®),
 5 adalimumab (HUMIRA®), pegsunercept TNF-R solúvel pegilado (sTNF-R1; Amgen); fragmento de anticorpo anti-TNF pegilado, CDP-870 (Celltech).

Exemplos de "drogas anti-reumáticas modificadoras de doenças" ou "DMARDs" incluem hidroxiclороquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (mais metotrexato oral e subcutâneo),
 10 azatioprina, D-penicilamina, sais de ouro (oral), sais de ouro (intramuscular), minociclina, ciclosporina incluindo ciclosporina A e ciclosporina local, proteína A de estafilococo (Goodyear e Silverman, *J. Exp. Med.*, 197 (9), págs. 1125-39 (2003)), incluindo seus sais e derivados etc.

Exemplos de "drogas antiinflamatórias não esteroidais" ou
 15 "NSAIDSs" incluem aspirina, ácido acetilsalicílico, ibuprofen, naproxen, indometacin, sulindac, tolmetin, inibidores de COX-2 tais como celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) benzenossulfonamida e valdecoxib (BEXTRA®) e meloxicam (MOBIC®), incluindo seus sais e derivados etc. Preferencialmente, eles são aspirina,
 20 naproxen, ibuprofen, indometacin ou tolmetin.

Exemplos de "anticorpos ou antagonistas de integrina" no presente incluem anticorpo CD11a ou LFA-1, tal como efalizumab (RAPTIVA®) disponível comercialmente por meio da Genentech ou anticorpo alfa 4 integrina tal como natalizumab (ANTEGRIN®) disponível por meio da Biogen Idec/Elan,
 25 ou derivados de fenilalanina diazacíclicos (WO 2003/89410), derivados de fenilalanina (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 e WO 2003/53926), derivados de ácido fenilpropiónico (WO 2003/10135), derivados de enamina (WO 2001/79173), derivados de ácido propanóico (WO

2000/37444), derivados de ácido alcanóico (WO 2000/32575), derivados de fenila substituído (Patentes Norte-Americanas nº 6.677.339 e 6.348.463), derivados de amina aromática (Patente Norte-Americana nº 6.369.229), polipeptídeos de domínio de disintegrina ADAM (US 2002/0042368), anticorpos para alfavbeta3 integrina (EP 633.945), derivados de aminoácidos bicíclicos com ponte aza (WO 2002/02556) e 683699 (Tanabe) etc.

“Corticoesteróide” designa qualquer dentre uma série de substâncias sintéticas ou de ocorrência natural com a estrutura química geral de esteróides que imitam ou aumentam os efeitos dos corticoesteróides de ocorrência natural. Exemplos de corticoesteróides sintéticos incluem prednisona, prednisolona (incluindo metilprednisolona), tal como metilprednisolona succinato de sódio SOLU-MEDROL®), dexametasona ou dexametasona triancinolona, hidrocortisona e betametasona. Os corticoesteróides preferidos no presente são prednisona, metilprednisolona, hidrocortisona ou dexametasona.

O termo “anticorpo” é utilizado no presente no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (tais como anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada.

“Fragmentos de anticorpos” compreendem uma parte de anticorpo intacto, que compreende preferencialmente a sua região de ligação de antígenos. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpos de fita simples; e anticorpos multiespecíficos formados com fragmentos de anticorpos.

“Anticorpo intacto” no presente é aquele que compreende duas regiões de ligação de antígenos e região Fc. Opcionalmente, o anticorpo intacto possui região Fc funcional.

Anticorpos “inibidores do crescimento” são aqueles que evitam ou reduzem a proliferação de uma célula que expressa um antígeno ao qual se liga o anticorpo. O anticorpo pode, por exemplo, evitar ou reduzir a proliferação de células B *in vitro* e/ou *in vivo*.

5 Os anticorpos que “induzem a apoptose” são aqueles que induzem a morte celular programada, por exemplo de célula B, conforme determinado por meio de testes padrão de apoptose, tais como ligação de anexina V, fragmentação de DNA, contração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de bolhas de membrana
10 (denominadas corpos apoptóticos). “Anticorpos nativos” são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por ligação de dissulfeto covalente, enquanto a quantidade de ligações de dissulfeto varia entre as cadeias
15 pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia leve e pesada também contém pontes de dissulfeto intracadeias em espaços regulares. Cada cadeia pesada contém, em uma extremidade, domínio variável (V_H) seguido por uma série de domínios constantes. Cada cadeia leve contém um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra
20 extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado ao primeiro domínio constante da cadeia pesada e o domínio variável da cadeia leve é alinhado ao domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

25 O termo “variável” indica o fato de que certas partes dos domínios variáveis diferem extensamente de sequência entre os anticorpos e são utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo específico para o seu antígeno específico. A capacidade de variação não é, entretanto, distribuída

regularmente ao longo de todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela é concentrada em três segmentos denominados regiões hipervariáveis, tanto nos domínios variáveis de cadeia leve quanto de cadeia pesada. As partes mais altamente conservadas de domínios variáveis são denominadas regiões de estrutura (FRs). Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada um, que adotam em grande parte configuração de folha β , conectadas por três regiões hipervariáveis, que formam laços que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha β . As regiões hipervariáveis de cada cadeia são mantidas juntas em boa proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígenos de anticorpos (vide Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de antígeno a antígeno, mas exibem diversas funções efectoras, tais como a participação do anticorpo em citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

A digestão de anticorpos por papaína produz dois fragmentos de ligação de antígenos idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada qual com um único sítio de ligação de antígenos, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete a sua capacidade de rápida cristalização. O tratamento com pepsina gera fragmento de $F(ab')_2$ que contém dois sítios de ligação de antígenos e ainda é capaz de reticular antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação de antígeno e de reconhecimento de antígeno completo. Esta região consiste de dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve em associação firme e não covalente. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígenos sobre a superfície do

dímero V_H-V_L . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígenos ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou a metade de um Fv que compreende apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em afinidade mais baixa que o sítio de ligação completo.

O fragmento de Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos de Fab' diferem de fragmentos de Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carbóxi do domínio CH1 de cadeia pesada, que inclui uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a denominação do presente para Fab', em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contém(êm) pelo menos um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos de Fab' que contêm cisteínas articuladas entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um dentre dois tipos claramente distintos, denominados capa (κ) e lambda (λ), com base nas seqüências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante das suas "cadeias pesadas" (quando presentes), anticorpos podem ser atribuídos a classes diferentes. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), tais como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são denominados α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais

de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

A menos que indicado em contrário, no presente a numeração dos resíduos em cadeias pesadas de imunoglobulina é a do índice EU como em Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991), expressamente incorporado ao presente como referência. O “índice EU como em Kabat” designa a numeração de resíduos do anticorpo IgG1 EU humano.

A expressão “região Fc” é utilizada no presente para definir região C-terminal de cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo regiões Fc de seqüência nativa e regiões Fc variantes. Embora as fronteiras da região Fc de cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humano é normalmente definida como estendendo-se a partir de resíduo de aminoácido na posição Cys226 ou de Pro230, até o seu terminal carboxila. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a produção ou purificação do anticorpo ou por meio de elaboração recombinante do ácido nucléico que codifica cadeia pesada do anticorpo. Conseqüentemente, composição de anticorpos intacos pode compreender populações de anticorpos com todos os resíduos de K447 removidos, populações de anticorpos sem resíduos de K447 removidos e populações de anticorpos que possuem mistura de anticorpos com e sem o resíduo de K447.

“Região Fc funcional” possui “função efetora” de região Fc de seqüência nativa. Exemplos de “funções efetoras” incluem ligação de C1q, citotoxicidade dependente de complemento, ligação de receptor Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação para baixo de receptores da superfície celular (tais como receptor de células B; BCR) etc. Essas funções efetoras geralmente necessitam que a região Fc seja combinada com domínio de ligação (tal como

domínio variável de anticorpo) e podem ser determinadas utilizando vários testes conforme descrito no presente, por exemplo.

“Região Fc de seqüência nativa” compreende seqüência de aminoácidos idêntica à seqüência de aminoácidos de região Fc encontrada na natureza. Regiões Fc humanas de seqüência nativa incluem região Fc de IgG1 humano de seqüência nativa (alotipos A e não A); região Fc de IgG2 humano de seqüência nativa; região Fc de IgG3 humano de seqüência nativa; e região Fc de IgG4 humano de seqüência nativa, bem como variantes de ocorrência natural de quaisquer das acima.

“Região Fc variante” compreende seqüência de aminoácidos que difere daquela de região Fc de seqüência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido, preferencialmente uma ou mais substituições de aminoácidos. Preferencialmente, a região Fc variante contém pelo menos uma substituição de aminoácido em comparação com região Fc de seqüência nativa ou com a região Fc de polipeptídeo parental, tal como cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácidos e, preferencialmente, cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácidos em região Fc de seqüência nativa ou na região Fc do polipeptídeo parental. A região Fc variante do presente possuirá preferencialmente pelo menos cerca de 80% de homologia com região Fc de seqüência nativa e/ou com região Fc de polipeptídeo parental e, de maior preferência, pelo menos cerca de 90% de homologia com ele, de maior preferência pelo menos cerca de 95% de homologia com ele.

“Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos” e “ADCC” designam reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores de Fc (FcRs) (tais como Células Matadoras Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado sobre célula alvo e causam em seguida a lise da célula alvo. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam unicamente

Fc γ RIII, enquanto monócitos expressam Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3, pág. 464, de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para determinar a atividade de ADCC de molécula de interesse, pode ser realizado teste ADCC *in vitro*, tal como o descrito na Patente Norte-Americana nº 5.500.362 ou 5.821.337. Células efetoras úteis para esses testes incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC) e células Matadoras Naturais (NK). Alternativa ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, tal como em modelo animal como o descrito em Clynes et al, *PNAS (U. S. A.)* 95: 652-656 (1998).

“Células efetoras humanas” são leucócitos que expressam uma ou mais FcRs e desempenham funções efetoras. Preferencialmente, as células expressam pelo menos Fc γ RIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC), células matadoras naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; em que PBMCs e células NK são preferidas.

As expressões “receptor de Fc” ou “FcR” são utilizadas para descrever receptor que se liga à região Fc de anticorpo. O FcR preferido é FcR humano de seqüência nativa. Além disso, FcR preferido é aquele que liga anticorpo de IgG (receptor gama) e inclui receptores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses receptores. Os receptores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (“receptor de ativação”) e Fc γ RIIB (“receptor de inibição”), que possuem seqüências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O receptor de ativação Fc γ RIIA contém motivo de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição Fc γ RIIB contém motivo de inibição com base em tirosina imunorreceptora (ITIM) no seu domínio citoplasmático (vide Daëron, *Annu.*

Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). FcRs são analisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" no presente. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto e homeostase de imunoglobulina (Guyer et al, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim et al, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" designa a capacidade de molécula de lisar alvo na presença de complemento. O processo de ativação de complementos é iniciado pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a uma molécula (tal como anticorpo) em complexo com antígeno cognato. Para determinar a ativação do complemento, pode ser realizado teste de CDC, conforme descrito, por exemplo, em Gazzano-Santoro et al, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Fragmentos de anticorpos "Fv de fita simples" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Preferencialmente, o polipeptídeo Fv compreende adicionalmente um ligante de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação de antígenos. Para análise de scFv, vide Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" designa pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígenos, que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipeptídeo ($V_H - V_L$). Utilizando ligante que é curto demais para permitir o pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os

domínios são forçados a parear-se com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígenos. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404.097, WO 93/11161 e Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993).

5 A expressão “anticorpo monoclonal”, da forma utilizada no presente, designa anticorpo obtido a partir de população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou ligam o(s) mesmo(s) epítopo(s), exceto por possíveis variantes que podem surgir durante a produção do
10 anticorpo monoclonal, em que essas variantes estão geralmente presentes em quantidades menores. Esse anticorpo monoclonal inclui tipicamente anticorpo que compreende seqüência de polipeptídeos que liga alvo, em que a seqüência de polipeptídeos de ligação de alvos foi obtida por meio de processo que inclui a seleção de uma única seqüência de polipeptídeos de ligação de alvo a partir
15 de uma série de seqüências de polipeptídeos. O processo de seleção pode ser, por exemplo, a seleção de um único clone a partir de uma série de clones, tal como conjunto de clones de hibridoma, clones de fagos ou clones de DNA recombinante. Dever-se-á compreender que a seqüência de ligação de alvo selecionada pode ser adicionalmente alterada, por exemplo, para aumentar a
20 afinidade para o alvo, para humanizar a seqüência de ligação de alvo, para aumentar a sua produção em cultura celular, para reduzir a sua imunogenicidade *in vivo*, para criar anticorpo multiespecífico etc., e que anticorpo que compreende a seqüência de ligação de alvo alterada também é anticorpo monoclonal de acordo com a presente invenção. Ao contrário das
25 preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal de preparação de anticorpos monoclonais é dirigido a um único determinante sobre antígeno. Além da sua especificidade, as preparações de

anticorpos monoclonais são vantajosas por tipicamente não serem descontaminadas por outras imunoglobulinas. O adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser considerado como exigindo a

5 produção do anticorpo por meio de qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados, por exemplo, por meio de uma série de métodos, que incluem, por exemplo, o método de hibridoma (tal como em Kohler et al, *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor

10 Laboratory Press, segunda edição, 1988); Hammerling et al, em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.816.567), tecnologias de exibição de fagos (vide, por exemplo, Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991);

15 Sidhu et al, *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (34): 12467-12472 (2004); e Lee et al, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004), e tecnologias de produção de anticorpos humanos ou similares a humanos em animais que possuem todos ou parte dos sítios de imunoglobulina humana ou

20 genes que codificam seqüências de imunoglobulina humana (vide, por exemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); Patentes Norte-Americanas nº 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas

25 da GenPharm); 5.545.807; WO 1997/17852; Patentes Norte -Americanas nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 e 5.661.016; Marks et al, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al, *Nature*

Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Os anticorpos monoclonais do presente incluem especificamente anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas), em que uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (Patente Norte-Americana nº 4.816.567; Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse no presente incluem anticorpos “primatizados”, que compreendem seqüências de ligação de antígenos de domínio variável derivadas de primatas não humanos (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, tal como babuíno, rhesus ou macaco cynomolgus) e seqüências de regiões constantes humanas (Patente Norte-Americana nº 5.693.780).

As formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm seqüência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nas quais os resíduos de região hipervariável do paciente são substituídos por resíduos de região hipervariável de espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos de região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem no

anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os laços hipervariáveis correspondem aos de imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de seqüência de imunoglobulina humana, exceto pela(s) substituição(ões) de FR indicada(s) acima. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma parte de região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones et al, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

A expressão “região hipervariável”, da forma utilizada no presente, indica os resíduos de aminoácidos de anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígenos. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de “região de determinação de complementaridade” ou “CDR” (tais como os resíduos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) e 95 a 102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)) e/ou os resíduos de “circuito hipervariável” (ou seja, os resíduos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) e 96 a 101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Resíduos de “estrutura” ou “FR” são os resíduos de domínios variáveis diferentes dos resíduos de região hipervariável conforme definido no presente.

“Anticorpo bruto”, para os propósitos do presente, é anticorpo que não é conjugado a porção citotóxica ou radiomarca.

Anticorpo “isolado” é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado de componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com usos terapêuticos ou em diagnóstico para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em realizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo, conforme determinado por meio do método de Lowry, e, de maior preferência, mais de 99% em peso; (2) até grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando seqüenciador de xícara de centrifugação; ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferencialmente, manchas de prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

Anticorpo “amadurecido por afinidade” é aquele com uma ou mais alterações em uma ou mais de suas regiões hipervariáveis, o que resulta em aumento da afinidade do anticorpo para antígeno, em comparação com anticorpo parental que não possui essa(s) alteração(ões). Os anticorpos amadurecidos por afinidade preferidos possuirão afinidades nanomolares ou até picomolares para o antígeno alvo. Os anticorpos amadurecidos por afinidade são produzidos por meio de procedimentos conhecidos na técnica. Marks et al, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992) descrevem amadurecimento por afinidade por meio de troca de domínios VH e VL. A mutagênese aleatória de resíduos de cadeia principal e/ou CDR é descrita por: Barbas et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al, *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al, *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al, *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); e Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

"Exposição ao anticorpo" designa contato com o anticorpo do presente ou exposição a ele em uma ou mais doses administradas ao longo de período de tempo de cerca de um a cerca de vinte dias. As doses podem ser administradas de uma vez ou em intervalos de tempo fixos ou irregulares ao longo desse período de exposição. Exposições de anticorpos iniciais e posteriores (tais como segunda e terceira) são separadas no tempo entre si conforme descrito em detalhes no presente.

O termo "bula" é utilizado para designar instruções costumeiramente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contra-indicações, outros produtos terapêuticos a serem combinados com o produto embalado e/ou avisos referentes à utilização desses produtos terapêuticos etc.

TRATAMENTO PRÉVIO DE AMOSTRA

Revelou-se no Exemplo abaixo que soro de pacientes com doenças autoimunes, tais como RA ou SLE, contém substância(s) que interfere(m) na capacidade de reprodução de bioteste com base em células, tal como teste de anticorpo neutralizante. A interferência não foi fator reumatóide (RF) nem imunoglobulina.

Vários métodos foram avaliados para abordar este problema, mas não foram particularmente bem sucedidos na recuperação ou anticorpos específicos, ou na eliminação da interferência do teste. Embora o aumento da diluição da amostra minimizasse a interferência, a sensibilidade do teste foi muito comprometida. Outros métodos para abordar o problema da interferência foram avaliados. Alteração do teste de ligação com base em células ou leitura de teste, por exemplo, não solucionou o problema, nem o tratamento prévio da amostra por meio de dessalinização, deslipidação, correlação de citocinas ou precipitação de sulfato de amônio saturado.

Purificação por afinidade de imunoglobulina foi identificada por fim como o método preferido de remoção da interferência. Esta etapa recuperou as imunoglobulinas do paciente para longe da interferência, de forma que as imunoglobulinas purificadas pudessem ser submetidas de forma mais confiável a bioteste com base em células.

Conseqüentemente, a presente invenção fornece método de tratamento de amostra biológica de paciente com doença autoimune que compreende:

- (a) deslipidação da amostra;
- (b) purificação por afinidade de imunoglobulinas na amostra;
- (c) concentração das imunoglobulinas purificadas; e
- (d) submissão das imunoglobulinas concentradas a teste de atividade biológica com base em células (preferencialmente teste de anticorpos neutralizantes).

As etapas (a), (b) e (c) podem ser realizadas em qualquer ordem, mas são preferencialmente conduzidas na forma da etapa (a), seguida pela etapa (b), seguida pela etapa (c).

A amostra biológica do presente inclui várias amostras que incluem soro, plasma, lisato celular, leite, saliva, fluido vítreo e outras secreções, fluido sinovial, fluido da cavidade peritoneal, fluido lacrimal e homogenado de tecido, mas preferencialmente a amostra compreende amostra de soro. Além disso, a amostra pode apresentar-se em várias formas, que incluem líquida, congelada, resfriada, liofilizada etc. A amostra pode ser submetida a etapas de tratamento ou purificação adicionais, antes e/ou depois da etapa de purificação de afinidade do presente.

A amostra biológica pode compreender imunoglobulinas do paciente que se ligam a anticorpo ou droga com o qual o paciente foi tratado, tal como anticorpo antimurino humano (HAMA), anticorpo antiquímérico

humano (HACA) ou anticorpo anti-humano humano (HAHA). HAHA pode ser contra anticorpo terapêutico humano ou humanizado. Em uma realização, a amostra é aquela que se tenha determinado contendo esses anticorpos. Soro do paciente pode ser encontrado, por exemplo, compreendendo anticorpos para a droga em questão por meio de teste ELISA, tal como os testes ELISA descritos no Pedido de Patente Norte-Americano nº 2005/0032130A1 (Beresini e Song) ou Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0068664 (Albitar et al).

A amostra é de paciente com doença autoimune, tal como as relacionadas acima, mas preferencialmente artrite reumatóide (RA), eritematose do lúpus sistêmico (SLE) ou mal de Sjogren, de maior preferência RA.

Além disso, o paciente de quem a amostra é obtida pode ser ou haver sido tratado com anticorpo terapêutico, imunoadesina ou outra droga biológica, tal como TNF-R solúvel pegilado (incluindo sTNF-R1 pegsunercept, Amgen), antagonista receptor de IL-1 (IL-1Ra), tal como anaquira (KINERET®), DN-BAFF (Xencor) ou vacina tal como vacina de linfoma de células B (incluindo as disponíveis por meio da CRV/ATROS, Intracel, Large Scale Biology, Favril, NCI, Genitope etc.) ou LeukoVAX (Inflammatics).

Quando o paciente houver sido tratado com anticorpo terapêutico, o anticorpo pode ligar marcador da superfície de células B, tal como anticorpo CD20, em que exemplos desses anticorpos incluem rituximab, 2H7 humanizado, anticorpo CD20 humano 2F2 (HuMax-CD20) (Genmab), anticorpo A20 humanizado ou IMMU-106 (Immunomedics), TRU 015 (Trubion) etc. O anticorpo CD20 preferido no presente é rituximab ou 2H7 humanizado.

Outros anticorpos terapêuticos de interesse incluem anticorpo fator de necrose tumoral (TNF)- α (tal como infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA®), fragmento de anticorpo TNF- γ pegilado tal como CDP-870, anticorpo policlonal anti-TNF- α tal como PassTNF); anticorpo de integrina (tal como efalizumab ou natalizumab); anticorpo BAFF (tal como

WO 03/33658); anticorpo BR3; anticorpo receptor de BAFF (tal como WO 02/24909); anticorpo Blys (tal como LYMPHOSTAT-B®, belimumab; HGS/CAT); anticorpo CD37 (tal como TRU 016, Trubion); anticorpo CD22, tal como LL2 ou epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), anticorpo CD22 da Abiogen, CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH), LIF 226 (Enhanced Lifesci.); VEGF ou anticorpo receptor de VEGF, incluindo bevacizumab (AVASTIN®) e ranibizumab (LUCENTIS®); anticorpo anti-HER, incluindo trastuzumab (HERCEPTIN®), pertuzumab (OMNITARG®) e cetuximab (ERBUTIX®); anticorpo anti-IgE, incluindo omalizumab (XOLAIR®); anticorpo IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticorpo anti-células B (Impheron); MAb direcionador de células B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); anticorpo Lym-1 tal como Oncolym anti-Lym-1 (USC/Peregrine); ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticorpo receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA®; Chugai/Roche); anticorpo IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticorpo receptor de quemoquina, tal como anticorpo CCR2 (por exemplo, MLN1202; Millienneum); anticorpo anti-complemento, tal como anticorpo C5 (por exemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulação oral de imunoglobulina humana (tal como IgPO; Protein Therapeutics); anticorpo IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818; BMS); anticorpo CD40, incluindo S2C6 e suas variantes humanizadas (WO 00/75348) e TNX 100 (Chiron/Tanox); anticorpo CD52 (tal como Campath); anticorpo $\nabla v\beta 3$ (VITAXIN®; Medimmune) etc.

Quando o paciente com doença autoimune houver sido tratado com imunoadesina, a imunoadesina pode ser BR3-Ig; imunoadesina TNF- α (tal como etanercept); peptídeo anti-BAFF (tal como WO 02/092620; Amgen); TACI-Ig (Zymogenetics) (tal como WO 00/40716); BCMA-Ig (Zymo Genetics) (tal como WO 01/12812); CTLA4-Ig, bloqueador de coestímulo de CD28 e B7,

tal como abatacept (BMS); BAFF-R-Fc (tal como WO 02/24909); etc.

A amostra biológica é geralmente obtida do paciente antes e/ou depois que o paciente tenha sido tratado com a droga, anticorpo ou imunoadesina. Normalmente, amostras biológicas são obtidas do paciente em uma série de
5 momentos, tais como do tratamento prévio ao longo de todo(s) o(s) ciclo(s) de tratamento. A fim de evitar interferência da droga com o desempenho do teste, amostra biológica será normalmente tomada quando ocorrer a lavagem da droga. Pode-se testar, por exemplo, amostra na linha base e após três, seis e nove meses. Caso o paciente seja novamente tratado posteriormente, amostra da linha base e
10 após três ou seis meses pode ser tratada previamente e testada em seguida para determinar o anticorpo neutralizante.

Etapa de deslipidação antes da purificação por afinidade é desejável para reduzir a obstrução durante a etapa de purificação por afinidade. Pode-se utilizar absorvente líquido (tal como LIPOSORB[®]; ésteres
15 de sorbitan/ésteres de polioxietileno sorbitan), mas outros métodos tais como extração orgânica, filtragem, centrifugação etc. são disponíveis para deslipidação da amostra.

A etapa de purificação por afinidade compreende preferencialmente a purificação de substancialmente todos os isotipos de
20 imunoglobulina (nomeadamente IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE humano, mesmo se a afinidade do adsorvente selecionado for diferente para os diferentes isotipos). Pode-se atingir purificação por afinidade por meio de cromatografia de proteína G, cromatografia de proteína G, cromatografia de proteína A + G (tal como cromatografia de proteína A/G conforme
25 exemplificado, ou mistura de resinas de Proteína A e Proteína G etc.), purificação por afinidade de IgG (utilizando, por exemplo, MELON GEL[®] da Pierce), purificação por afinidade de anticorpo antiimunoglobulina (em que os anticorpos antiimunoglobulina são utilizados isoladamente ou em combinação

com especificidade para um ou mais isotipos; por exemplo, combinação de IgG anti-humano, IgA, IgM e IgE, acoplados para purificação por afinidade específica de cada isotipo); outro adsorvente com propriedades de ligação de imunoglobulina (tal como PIERCE T-GEL®) etc. Preferencialmente, purificação por afinidade compreende purificação por afinidade de Proteína A + G.

A purificação por afinidade (tal como purificação por afinidade de Proteína A + G) é preferencialmente repetida duas, três, quatro ou mais vezes, de maior preferência três vezes. Após o carregamento da coluna de afinidade, a fase sólida é preferencialmente lavada para remover ligação não específica e as imunoglobulinas podem ser eluídas utilizando vários tampões de eluição. O tampão de eluição preferido é compatível com teste de anticorpo neutralizante com base em células subsequente. O tampão de eluição pode ter, por exemplo, baixo pH e/ou conter ácido clorídrico (HCl), glicina, ácido trifluoroacético (TFA), ácido acético etc. O tampão de eluição é opcionalmente neutralizado com tampão básico e/ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) pode ser adicionada antes da realização de teste de anticorpo neutralizante.

Em uma realização, as imunoglobulinas purificadas são submetidas a etapas de purificação, tratamento e concentração adicionais. As imunoglobulinas podem ser concentradas, por exemplo, utilizando concentrador, ou precipitadas e novamente suspensas, ou liofilizadas etc.

A amostra que compreende imunoglobulinas concentradas ou purificadas é capaz em seguida de ser submetida a teste de anticorpos neutralizantes, tais como os descritos no capítulo a seguir. A amostra pode compreender polipeptídeos que contêm Fc purificados, tais como imunoglobulinas do paciente (incluindo autoanticorpos e anticorpos antidrogas), anticorpos terapêuticos e imunoadesinas e fator reumatóide (RF).

Embora teste de anticorpos neutralizantes seja o bioteste com base em células preferido no presente, a amostra previamente tratada pode ser

submetida a outros testes biológicos com base em células, que incluem, por exemplo, teste biomarcador farmacodinâmico (PD) que pode medir a atividade funcional de droga em soro do paciente sobre células etc.

TESTE DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES

5 O método de tratamento prévio de amostra no presente é preferencialmente empregado em conjunto com teste de detecção de anticorpos neutralizantes para a droga, tais como anticorpo terapêutico ou imunoadesina ou outro biológico, ou anticorpo ou antagonista que se liga a marcador da superfície de células B (tal como para anticorpo que liga CD20). O
10 teste determina a capacidade de amostra biológica de paciente tratado com o anticorpo terapêutico, imunoadesina ou outra droga de bloquear atividade biológica da droga, em que a atividade bloqueadora pode indicar redução da eficácia da droga.

Anticorpos neutralizantes podem reduzir o nível farmacológico
15 esperado da droga em infusão, de forma a reduzir a eficácia ou tornar mais variável a probabilidade de reação. Anticorpos neutralizantes podem ser associados a doenças do soro ou doenças do complexo imunológico mediante novo tratamento. Ao observar-se reação de anticorpo neutralizante, por exemplo, o tratamento pode ser suspenso ou postergado, ou a dosagem pode
20 ser aumentada, ou o paciente pode receber agentes adicionais que aumentem a eficácia da droga e/ou que reduzam qualquer reação imunológica. Vários agentes imunossuppressivos que podem ser combinados com o tratamento para reduzir reação imunológica, em que reação de anticorpos neutralizantes é observada, são conhecidos e exemplos dessas drogas são indicados
25 especificamente no presente.

Além do uso dos resultados de teste por médicos no tratamento de pacientes, a propriedade neutralizante de anticorpos antidrogas, em conjunto com dados de HAMA, HACA ou HAHA, demonstram a

imunogenicidade, ou tendência à imunogenicidade, bem como a natureza da imunogenicidade de drogas. Esta informação é útil para avaliar a segurança da droga e prever potenciais reações imunológicas de pacientes a terapias.

No contexto de anticorpo CD20 ou outro antagonista que uma
5 marcador da superfície de células B, acredita-se que o teste seja particularmente útil quando o tratamento com ele gere apenas esgotamento parcial de células B, em que esteja ocorrendo hiperativação de células B (tal como em SLE) ou em que existam sintomas persistentes da doença por vários anos (tal como em SLE e RA).

10 O uso do teste com relação a pacientes que estão sendo tratados com a droga para tratar doença autoimune é especialmente desejável. Várias doenças autoimunes são descritas no presente, mas exemplos incluem artrite reumatóide (RA), eritematose do lúpus sistêmico (SLE), mal de Wegener, doença intestinal inflamatória, púrpura trombocitopênica imune ou idiopática
15 (ITP), púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), trombocitopenia autoimune, esclerose múltipla (MS), psoríase, nefropatia de IgA, polineuropatias de IgM, miastenia grave, vasculite, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, glomerulonefrite, anemia hemolítica autoimune etc.

Na realização preferida da presente invenção, o teste de atividade
20 biológica compreende teste biológico com base em células, tal como teste que determina a citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), apoptose, modulação de canais de íons ou inibição do crescimento celular.

Preferencialmente, o teste estuda a atividade de CDC. Segundo
25 esta realização da presente invenção, células que expressam o antígeno (tal como marcador da superfície de células B, tal como CD20) ao qual liga-se o anticorpo terapêutico ou imunoadesina podem ser expostas a complemento (preferencialmente complemento humano) na presença (ou ausência) da

droga, bem como amostra biológica de paciente tratado com a droga. O presente pedido contempla a exposição dos quatro componentes (células, complemento, droga e amostra biológica) simultânea ou seqüencialmente em qualquer ordem; todas estas possibilidades são englobadas no presente.

- 5 Segundo a realização preferida da presente invenção, entretanto, a amostra biológica (tal como soro) é combinada com a droga, de forma a permitir a neutralização da atividade da droga e, em seguida, células e complemento são adicionados a esta mistura.

Citotoxicidade dependente de complemento (CDC) como teste de anticorpos neutralizantes de Rituximab é ilustrada na Fig. 4. O domínio de Fab de Rituximab liga -se a CD20, antígeno da superfície celular sobre linfócitos B. Uma vez ligado, o domínio Fc de Rituximab recrutará complemento e mediará a lise celular. *In vitro*, o Rituximab é adicionado junto com complemento de soro humano normal a células WIL2-S. A lise celular é medida proporcionalmente à atividade metabólica mitocôndrica de células vivas utilizando ALAMAR BLUE® ou CELLTITER GLO® (painel superior). Ao utilizar este teste de CDC para determinar anticorpos de neutralização de Rituximab em soro do paciente, o Rituximab é previamente incubado com os anticorpos do paciente, antes da introdução de complemento e células (painel inferior). Anticorpo neutralizante

10 15 20

reduzirá a potência de Rituximab, resultando em quantidades maiores de células vivas metabolicamente ativas. A quantidade de atividade neutralizante em soro de paciente é medida proporcionalmente a aumento de sinais ALAMAR BLUE® ou CELLTITER GLO® em com relação a controle negativo.

Após a etapa de exposição, é determinada a atividade de CDC, preferencialmente determinando-se a viabilidade celular (ou seja, quantificando-se as células vivas). Vários métodos são disponíveis para determinar a viabilidade celular, incluindo a determinação da perda de integridade da membrana conforme avaliado por meio de absorção de iodeto

25

de propídio (PI), azul de tripano (vide Moore et al, *Cytotechnology* 17: 1-11 (1995)), anexina V ou 7AAD com relação a células não tratadas, o teste de ALAMAR BLUE® (resazurin) como no Pedido de Patente Norte-Americano nº 2005/0032130A1 (Beresini e Song) ou teste modificado utilizando Teste de Viabilidade de Células Luminescentes CELLTITER-GLO® para a leitura de teste conforme descrito abaixo etc. Redução da capacidade do anticorpo ou da imunoadesina de mediar CDC pode indicar que anticorpos neutralizantes estão presentes na amostra biológica.

Para teste com base em células, geralmente será utilizada linhagem celular que expressa o antígeno ao qual se liga o anticorpo ou a imunoadesina. No caso do antígeno CD20, várias células são disponíveis, incluindo células WIL2-S (ATCC CRL 8885, Coleção Norte-Americana de Culturas de Tipos) ou WIL2-NS (ATCC CRL-8155), SU-DHL-4 (DSMZ Nº ACC495, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), ou linhagem de células B linfoblastóides que expressam CD20. Testes de CDC que utilizam células CD20 positivas foram descritas em Idusogie et al, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000); Idusogie et al, *J. Immunol.* 166: 2571-2575 (2001); Reff et al, *Blood* 83 (2): 435-445 (1994); Patente Norte-Americana nº 6.194.551 B1 (Idusogie et al); e Patente Norte-Americana nº 5.736.137 (Anderson et al).

Quando o teste avaliar ADCC, o anticorpo ou imunoadesina pode ser testado para determinar a sua capacidade de mediar a lise de células Matadoras Naturais (células NK) e/ou células mononucleares do sangue periférico (PMBC) que expressam o antígeno ao qual se liga o anticorpo terapêutico. No caso do antígeno CD20, podem ser utilizadas células WIL2-S e Shields et al, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001) e WO 00/42072 (Presta, L.) descrevem exemplo de teste de ADCC utilizando estas células. Vide também Clynes et al, *Nature Medicine* 6: 443-6 (2000). A Patente Norte-Americana nº 5.736.137 (Anderson et al) também descreve teste ADCC utilizando células CD20 positivas.

Apoptose designa morte celular programada, por exemplo de célula B, e pode ser determinada por meio de uma série de testes diferentes, tais como ligação de anexina V, fragmentação de DNA, contração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de

5 bolhas de membrana (denominadas corpos apoptóticos). Testes que determinam a capacidade de anticorpo (tal como Rituximab) de induzir a apoptose foram descritos em Shan et al, *Cancer Immunol. Immunother.* 48: 673-83 (2000); Pedersen et al, *Blood* 99: 1314-9 (2002); Demidem et al, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12 (3): 177-186 (1997), por exemplo.

10 A capacidade de anticorpo ou imunoadesina de inibir o crescimento de células, tais como células B cancerosas que expressam o antígeno ao qual se liga o antagonista ou anticorpo, pode ser determinada por meio de uma série de diferentes testes. Taji et al, *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 748-56 (1998), descrevem como determinar a inibição do crescimento de linhagens

15 de células de linfoma B CD20 positivas por anticorpo CD20.

Utilizando o teste de anticorpos neutralizantes do presente, pode-se determinar a eficácia de droga (tal como uma que una CD20) medindo-se a capacidade de amostra biológica de paciente tratado com a droga de bloquear a sua atividade biológica, em que redução da atividade biológica com relação a

20 amostra controle indica que o paciente está levantando anticorpos contra a droga em questão e/ou que esses anticorpos podem neutralizar, ao menos até certo ponto, a sua atividade biológica. Reação significativa pode ser aquela que resulta em problema relativo à segurança a partir do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e/ou da necessidade de alterar a dosagem da droga

25 primária em resposta à liberação alterada da droga. Em comparação com a mesma quantidade de parceiro de tratamento prévio (tal como HAMA, HACA e HABA negativo), por exemplo, amostra que neutraliza cerca de 20% ou mais da atividade da droga (tal como na faixa de cerca de 20% a cerca de 100%) em

dada concentração pode ser considerada positiva para anticorpos neutralizantes dirigidos contra a droga.

O teste de anticorpos neutralizantes preferido do presente é baseado no descrito em US 2005/0032130 A1 (Beresini e Song), publicada em dez de fevereiro de 2005, mas modificado em vários aspectos conforme descrito com mais detalhes no Exemplo 1 abaixo. Particularmente, a amostra biológica (ou seja, soro) é agora soro previamente tratado; Teste de Viabilidade de Células Luminescentes CELLTITER-GLO® é agora a leitura de teste em vez de ALAMAR BLUE® (resazurin); anticorpo controle utilizado é preparação purificada de Proteína A de macaco cynomolgus (HER2 adsorvida), não anti-Rituximab de cabra; e tampões, volumes, complemento, controles, efeitos em matriz de soro, análise de dados e interpretação foram alterados conforme descrito no Exemplo 1.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

A droga de interesse no presente pode ser anticorpo terapêutico, tal como um que se liga a marcador da superfície de células B, especialmente um que se liga a CD20. Conseqüentemente, serão descritos no presente métodos de geração de anticorpos.

O antígeno a ser utilizado para a produção ou seleção de anticorpos pode ser, por exemplo, forma solúvel do antígeno ou sua parte que contém o epítopo desejado. Alternativa ou adicionalmente, as células que expressam o antígeno na sua superfície celular podem ser utilizadas para gerar ou selecionar anticorpos. Outras formas do antígeno úteis para a geração de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto.

Segue-se descrição de exemplos de técnicas de produção dos anticorpos utilizados de acordo com a presente invenção.

(i) Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são preferencialmente elevados em

animais por meio de diversas injeções subcutâneas (sc), intraperitoneais (ip) ou intramusculares (im) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína que seja imunogênica na espécie a ser imunizada tal como hemocianina de conchas, albumina de soro, 5 tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, utilizando agente bifuncional ou derivatizante, tal como éster maleimidobenzoil sufossuccinimida (conjugação por meio de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (por meio de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R^1 são grupos alquila diferentes.

10 Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos ou derivados por meio da combinação, por exemplo, de 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com três volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução de forma intradérmica em diversos sítios. Um mês mais tarde, os 15 animais são incentivados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund, por meio de injeção subcutânea em diversos sítios. Sete a quatorze dias mais tarde, os animais são sangrados e o soro é testado para determinar a titulação de anticorpos. Os animais são incentivados até a estabilização do título. Preferencialmente, o animal é 20 incentivado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado a proteína diferente e/ou por meio de reagente reticulante diferente. Os conjugados podem também ser elaborados em cultura celular recombinante, na forma de fusões de proteínas. Além disso, agentes agregantes tais como alúmen são adequadamente utilizados para aumentar a reação imunológica.

25 (ii) *Anticorpos Monoclonais*

Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou ligam o mesmo epítipo, exceto por

possíveis variantes que surgem durante a produção do anticorpo monoclonal, em que essas variantes estão geralmente presentes em quantidades menores. Desta forma, o adjetivo “monoclonal” indica a característica do anticorpo como não sendo mistura de anticorpos discretos ou policlonais.

5 Os anticorpos monoclonais podem ser fabricados, por exemplo, utilizando o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al, *Nature* 256: 495 (1975) ou podem ser fabricados por meio de métodos de DNA recombinante (Patente Norte-Americana nº 4.816.567).

10 No método de hibridoma, camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como hamster, é imunizado na forma descrita acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são fundidos em seguida a células de mieloma, utilizando agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para
15 formar célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma preparadas desta forma são semeadas e cultivadas em meio de cultura apropriada que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células
20 de mieloma parentais não fundidas. Caso as células de mieloma parentais não contenham a enzima hipoxantino guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), por exemplo, o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

25 Células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a meio tal como meio HAT. Dentre estas, as linhagens celulares de mieloma preferidas são

linhagens de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis por meio do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis por meio da Coleção Norte-Americana de Culturas de

5 Tipos, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano-de camundongos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); e Brodeur et al, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

10 O meio de cultura no qual as células de hibridoma estão crescendo é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por meio de imunoprecipitação ou de teste de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio

15 imunoabsorvente ligado por enzimas (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, por meio da análise Scatchard de Munson et al, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após a identificação de células de hibridoma que produzem

20 anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados por meio da limitação de procedimentos de diluição e cultivados por meio de métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de culturas apropriadas para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM

25 ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores de ascite em animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por

meio de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como proteína A Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

DNA que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e seqüenciado utilizando procedimentos convencionais (empregando, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que sejam capazes de ligar-se especificamente a genes que codificam as cadeias leve e pesada de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem de fonte preferida desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de análise sobre a expressão recombinante em bactérias de DNA que codificam o anticorpo incluem Skerra et al, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) e Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

Em realização adicional, anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos geradas utilizando as técnicas descritas em McCafferty et al, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subseqüentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) por meio de mistura de cadeias (Marks et al, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), bem como infecções combinatórias e recombinação *in vivo*, como estratégia de construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse et al, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Desta forma, essas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma de

anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O DNA pode também ser modificado, por exemplo, por meio de substituição da seqüência de codificação por domínios constantes de cadeia leve e pesada humana no lugar das seqüências murinas homólogas (Patente Norte-Americana nº 4.816.567; Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 6851 (1984)), ou por meio de ligação covalente da seqüência de codificação de imunoglobulina com a seqüência de codificação para polipeptídeo não de imunoglobulina, no todo ou em parte.

Tipicamente, esses polipeptídeos não de imunoglobulina são substituídos pelos domínios constantes de anticorpo ou são substituídos pelos domínios variáveis de sítio de combinação de antígenos de anticorpo para criar anticorpo bivalente quimérico que compreende um sítio de combinação de antígenos que possui especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação de antígenos que possui especificidade para antígeno diferente.

(iii) *Anticorpos Humanizados*

Métodos de humanização de anticorpos não humanos foram descritos na técnica. Preferencialmente, anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são freqüentemente denominados resíduos “importados”, que são tomados tipicamente a partir de domínio variável “importado”. A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), por meio de substituição de seqüências de regiões hipervariáveis pelas seqüências correspondentes de anticorpo humano. Conseqüentemente, esses anticorpos “humanizados” são anticorpos quiméricos (Patente Norte-Americana nº 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído

pela sequência correspondente de espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de regiões hipervariáveis e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

5 A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na fabricação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o chamado método de “melhor adequação”, a sequência do domínio variável de anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de seqüências de
10 domínio variável humanas conhecidas. A sequência humana que é mais próxima da do roedor é aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Outro método utiliza região de estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos
15 humanos de um subgrupo específico de regiões variáveis de cadeia leve ou pesada. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 4285 (1992); Presta et al, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

 É adicionalmente importante que os anticorpos sejam
20 humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com método preferido, anticorpos humanizados são preparados por meio de processo de análise das seqüências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das seqüências
25 parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e familiares para os técnicos no assunto. São disponíveis programas de computador que ilustram e exibem prováveis estruturas de conformação tridimensional de possíveis seqüências de

imunoglobulina selecionadas. A inspeção destas exposições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da possível seqüência de imunoglobulina, ou seja, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da possível imunoglobulina de ligar o seu antígeno. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das seqüências receptora e importada para atingir a característica de anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo. Geralmente, os resíduos da região hipervariável são direta e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígenos.

(iv) *Anticorpos humanos*

Como alternativa para a humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. É agora possível produzir, por exemplo, animais transgênicos (tais como camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a exclusão homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada de anticorpos (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem germinativa resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linhagem germinativa humana nesses camundongos com mutação da linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio com antígenos. Vide, por exemplo, Jakobovits et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); e Patentes Norte-Americanas nº 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807.

Alternativamente, pode-se utilizar tecnologia de exibição de fagos (McCafferty et al, *Nature* 348: 552-553 (1990)) para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro* a partir de repertórios de genes de

domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpos são clonados em quadro em gene de proteína de revestimento maior ou menor de bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e exibidos na forma de

5 fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene codificador do anticorpo que

10 da célula B. A exibição de fagos pode ser realizada em uma série de formatos; para sua análise, vide, por exemplo, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição de fagos. Clackson et

15 al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) isolaram conjunto diverso de anticorpos anti-oxazolona a partir de pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados de baços de camundongos imunizados. Repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para conjunto diverso de antígenos (incluindo autoantígenos) podem ser isolados

20 seguindo-se essencialmente as técnicas descritas por Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou Griffith et al, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Vide também as Patentes Norte-Americanas nº 5.565.332 e 5.573.905.

Anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (vide as Patentes Norte-Americanas nº 5.567.610 e 5.229.275).

(v) *Fragmentos de anticorpos*

25 Foram desenvolvidas diversas técnicas de produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide por exemplo, Morimoto et al, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117

(1992); e Brennan et al, *Science* 229: 81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados, por exemplo, a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima.

5 Alternativamente, fragmentos de Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter et al, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos de F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir do cultura de células hospedeiras recombinantes. Outros métodos de produção de
10 fragmentos de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto. Em outras realizações, o anticorpo selecionado é fragmento de Fv de fita simples (scFv). Vide WO 93/16185; Patente Norte-Americana nº 5.571.894; e Patente Norte-Americana nº 5.587.458. O fragmento de anticorpo pode também ser
15 "anticorpo linear", tal como descrito na Patente Norte-Americana nº 5.641.870, por exemplo. Esses fragmentos de anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

(vi) *Anticorpos biespecíficos*

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois epítomos diferentes. Exemplos
20 de anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítomos diferentes do marcador da superfície de células B. Outros desses anticorpos podem ligar o marcador de células B e ligar adicionalmente segundo marcador da superfície de células B diferente. Alternativamente, braço de ligação anti-marcador da superfície de células B pode ser combinado com um braço que se liga a uma
25 molécula acionadora sobre um leucócito, tal como uma molécula receptora de células T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou receptores de Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), de forma a dirigir mecanismos de defesa celular para a célula B. Anticorpos biespecíficos podem

também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para a célula B. Esses anticorpos possuem braço de ligação de marcador da superfície de células B e braço que liga o agente citotóxico (tal como saporina, anti-interferona- α , vinca alcalóide, cadeia A rícina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo).

- 5 Anticorpos biespecíficos podem ser preparados na forma de anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (tais como anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

Métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de
10 comprimento total é baseada na coexpressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Millstein et al, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Devido à seleção aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem mistura potencial de dez moléculas de
15 anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que normalmente é realizada por meio de etapas de cromatografia de afinidade, é um tanto problemática e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são descritos em WO 93/08829 e em Traunecker et al, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

20 De acordo com abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligações desejadas (sítios de combinação de anticorpos e antígenos) são fundidos a seqüências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão ocorre preferencialmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das
25 regiões de articulação, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de

imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são cotransfectados em organismo hospedeiro apropriado. Isso proporciona grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeos em realizações quando razões desiguais das três cadeias de polipeptídeos utilizadas na construção fornecerem os rendimentos ideais. É possível, entretanto, inserir as seqüências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeos em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeos em razões iguais resultar em altos rendimentos ou quando as razões não forem de significação específica.

Em realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com primeira especificidade de ligação em um braço e um par de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (que fornece segunda especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que esta estrutura assimétrica possibilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica proporciona forma fácil de separação. Esta abordagem é descrita em WO 94/04690. Para detalhes adicionais de geração de anticorpos biespecíficos, consulte, por exemplo, Suresh et al, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente Norte-Americana nº 5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser elaborada de forma a maximizar o percentual de heterodímeros que são recuperados do cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (tais como tirosina ou triptofano). "Cavidades"

compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas sobre a interface da segunda molécula de anticorpo, por meio da substituição de grandes cadeias laterais de aminoácidos com cadeias menores (tais como alanina ou treonina). Isso proporciona mecanismo de aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou “heteroconjugados”. Um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado, por exemplo, a avidina e o outro a biotina. Esses anticorpos foram propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunológico a células indesejadas (Patente Norte-Americana nº 4.676.980) e para o tratamento de infecções por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373 e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser fabricados utilizando qualquer método reticulante conveniente. Agentes reticulantes apropriados são bem conhecidos na técnica e são descritos na Patente Norte-Americana nº 4.676.980, juntamente com uma série de técnicas reticulantes.

As técnicas de geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados, por exemplo, utilizando ligações químicas. Brennan et al, *Science*, 229: 81 (1985) descrevem procedimento em que anticorpos intactos são divididos proteoliticamente para gerar fragmentos de $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente formador de complexo de ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vizinhos e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos de Fab' gerados são convertidos em seguida em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab' -TNB é então novamente convertido no Fab' -tiol por meio de redução com mercaptoetilamina e é misturado com quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Diversas técnicas de fabricação e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultura celular recombinante também foram descritas. Anticorpos biespecíficos foram produzidos, por exemplo, utilizando zíper de leucina. Kostelny et al, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às partes Fab' de dois anticorpos diferentes por meio de fusão genética. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e, em seguida, novamente oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993) forneceu mecanismo alternativo de fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é curto demais para permitir o pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Conseqüentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a parear-se com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, de maneira a formar dois sítios de ligação de antígenos. Outra estratégia de fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos utilizando dímeros Fv de fita simples (sFv) também foi relatada. Vide Gruber et al, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

São contemplados anticorpos com mais de duas valências. Podem ser preparados, por exemplo, anticorpos triespecíficos. Tutt et al, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

PRODUÇÃO DE IMUNOADESINAS

A droga no presente pode ser, em outra realização, imunoadesina, tal como BR3-Ig ou TNF- α imunoadesina. Exemplos de métodos de elaboração de

imunoadesinas são descritos com mais detalhes abaixo.

O projeto mais simples e mais direto de imunoadesina combina o(s) domínio(s) de ligação da adesina (por exemplo, o domínio extracelular (ECD) de um receptor) com a região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Normalmente, ao preparar as imunoadesinas de acordo com a presente invenção, ácido nucleico que codifica o domínio de ligação da adesina será fundido C-terminal a ácido nucleico que codifica o terminal N de uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina, mas fusões N-terminais também são possíveis.

Tipicamente, nessas fusões, o polipeptídeo quimérico codificado reterá pelo menos domínios C_{H2} , C_{H3} e de articulação funcionalmente ativos da região constante de cadeia pesada de imunoglobulina. Também são realizadas fusões para o terminal C da porção Fc de domínio constante ou imediatamente N-terminal para o C_{H1} da cadeia pesada ou a região correspondente da cadeia leve. O sítio preciso no qual a fusão é realizada não é crítico; os sítios específicos são bem conhecidos e podem ser selecionados a fim de otimizar a atividade biológica, secreção ou características de ligação da imunoadesina.

Em realização preferida, a seqüência de adesina é fundida ao terminal N da região Fc de imunoglobulina G_1 (IgG_1). É possível fundir toda a região constante de cadeia pesada à seqüência de adesina. Entretanto, de maior preferência, seqüência que se inicia na região de articulação pouco acima do sítio de divisão de papaína que define IgG Fc quimicamente (ou seja, o resíduo 216, tomando o primeiro resíduo da região constante de cadeia pesada como sendo 114) ou sítios análogos de outras imunoglobulinas é utilizada na fusão. Em realização particularmente preferida, a seqüência de aminoácidos de adesina é fundida (a) à região de articulação e C_{H2} e C_{H3} ou (b) aos domínios C_{H1} ,

de articulação, C_H2 e C_H3 de cadeia pesada de IgG.

Para imunoadesinas biespecíficas, as imunoadesinas são ligadas na forma de multímeros e, particularmente, como heterodímeros ou heterotetrâmeros. De forma geral, essas imunoglobulinas ligadas
5 conterão estruturas unitárias conhecidas. Uma unidade estrutural com quatro cadeias básica é a forma na qual existem IgG, IgD e IgE. Unidade de quatro cadeias é repetida nas imunoglobulinas com peso molecular mais alto; IgM geralmente existe na forma de pentâmero de quatro unidades básicas mantidas juntas por ligações de dissulfeto. IgA globulina
10 e, ocasionalmente, IgG globulina podem também existir em forma multimérica no soro. No caso de multímero, cada uma das quatro unidades pode ser idêntica ou diferente.

Vários exemplos de imunoadesinas ligadas dentro do escopo do presente são diagramadas esquematicamente abaixo:

- 15 (a) AC_L-AC_L ;
 (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$;
 (c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, \text{ ou } V_LC_L-V_HC_H)$
 (d) $AC_L-V_HC_H-(AC_H, \text{ or } AC_L-V_HC_H, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$;
 (e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H, \text{ ou } V_LC_L-AC_H)$; e
 20 (f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)_2$,

em que cada A representa seqüências de aminoácidos de adesina idênticas ou diferentes;

- V_L é domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;
- V_H é um domínio variável de cadeia pesada de
25 imunoglobulina;
- C_L é domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;
- C_H é domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina;

- n é número inteiro maior que 1;
- Y designa o resíduo de agente reticulante covalente.

Por motivo de brevidade, as estruturas acima exibem apenas as características principais; elas não indicam ligação (J) ou outros domínios das imunoglobulinas, nem as ligações de dissulfeto são exibidas. Entretanto, quando esses domínios forem necessários para atividade de ligação, eles deverão ser construídos para que estejam presentes nos sítios comuns que ocupam nas moléculas de imunoglobulina.

Alternativamente, as seqüências de adesina podem ser inseridas entre seqüências de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, de tal forma que seja obtida uma imunoglobulina que compreende cadeia pesada quimérica. Nesta realização, as seqüências de adesina são fundidas à extremidade 3' de cadeia pesada de imunoglobulina em cada braço de imunoglobulina, seja entre a articulação e o domínio C_H2 ou entre os domínios C_H2 e C_H3 . Construções similares foram relatadas por Hoogenboom et al, *Mol. Immunol.* 28: 1027-1037 (1991).

Embora a presença de cadeia leve de imunoglobulina não seja necessária nas imunoadesinas de acordo com a presente invenção, cadeia leve de imunoglobulina poderá estar presente associada covalentemente a polipeptídeo de fusão de cadeia pesada de imunoglobulina e adesina ou fundida diretamente à adesina. No caso anterior, DNA que codifica cadeia leve de imunoglobulina é tipicamente coexpresso com o DNA que codifica a proteína de fusão da cadeia pesada de imunoglobulina e adesina. Mediante secreção, a cadeia leve e a cadeia pesada híbrida serão covalentemente associadas para fornecer estrutura similar a imunoglobulina que compreende dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina ligados por dissulfeto. Os métodos apropriados

para a preparação dessas estruturas são, por exemplo, descritos na Patente Norte-Americana nº 4.816.567, emitida em 28 de março de 1989.

As imunoadesinas são construídas de forma mais convenientemente por meio da fusão da seqüência de cDNA que codifica a porção de adesina em quadro a seqüência de cDNA de imunoglobulina. Pode ser também utilizada, entretanto, fusão a fragmentos de imunoglobulina genômica (vide, por exemplo, Aruffo et al, *Cell* 61: 1303-1313 (1990); e Stamenkovic et al, *Cell* 66: 1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusão requer a presença de seqüências reguladoras de Ig para expressão. cDNAs que codificam regiões constantes de cadeia pesada de IgG podem ser isolados com base em seqüências publicadas de bibliotecas de cDNA derivadas de linfócitos de sangue periférico ou do baço, por meio de técnicas de hibridização ou reação em cadeia de polimerase (PCR). Os cDNAs que codificam a "adesina" e as partes de imunoglobulina da imunoadesina são inseridos em conjunto em vetor de plasmídeo que dirige a expressão eficiente nas células hospedeiras selecionadas.

As imunoadesinas do presente incluem corpos de peptídeos, que podem ser elaborados, por exemplo, conforme descrito em WO 02/092620.

Outras publicações que descrevem imunoadesinas de interesse incluem: WO 01/12812 que descreve BCMA-Fc; WO 02/24909 relativa a BAFF-R-Fc; WO 00/40716 referente a TACI-Ig etc.

CONJUGADOS E OUTRAS MODIFICAÇÕES DO ANTICORPO OU IMUNOADESINA

O anticorpo ou imunoadesina do presente é opcionalmente conjugado a outro agente, tal como agente citotóxico, ou citocina (tal como IL2; vide, por exemplo, WO 2005/016969).

A conjugação normalmente será atingida por meio de ligação covalente, cuja natureza precisa será determinada pela molécula

direcionadora e pelo sítio de ligação sobre o polipeptídeo anticorpo ou antagonista de CD20. Tipicamente, agente não peptídico é modificado por meio da adição de ligante que permite a conjugação a anticorpo ou imunoadesina por meio das suas cadeias laterais de aminoácidos, cadeias de carboidratos ou grupos reativos introduzidos sobre o anticorpo ou imunoadesina por meio de modificação química. Droga pode ser ligada, por exemplo, por meio do grupo ϵ -amino de resíduo de lisina, por meio de grupo α -amino livre, por meio de troca de dissulfeto para resíduo de cisteína ou por oxidação dos 1,2-dióis em cadeia de carboidrato com ácido periódico para permitir a ligação de drogas que contêm vários nucleófilos por meio de ligação de base Schiff. Vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.256.833. Os agentes modificadores de proteínas incluem reagentes amino-reativos (tais como ésteres reativos, isotiocianatos, aldeídos e haletos de sulfonila), reagentes tiol-reativos (tais como derivados de haloacetila e maleimidas) e reagentes reativos a ácido carboxílico e aldeído. Polipeptídeos de anticorpos ou antagonistas de CD20 podem ser ligados covalentemente a agentes peptídicos utilizando reagentes reticulantes bifuncionais. Reagentes heterobifuncionais são mais comumente utilizados e permitem o acoplamento controlado de duas proteínas diferentes utilizando duas porções reativas diferentes (tais como amino-reativas mais tiol, iodoacetamida ou maleimida). O uso desses agentes ligantes é bem conhecido na técnica. Vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.671.958. Ligantes peptídicos podem também ser empregados. Alternativamente, o anticorpo ou imunoadesina pode ser ligada a porção peptídica por meio da preparação de polipeptídeo de fusão.

Exemplos de agentes acopladores de proteínas bifuncionais adicionais incluem propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila),

iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolieno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

Alternativamente, pode ser fabricada proteína de fusão que compreende o anticorpo/imunoadesina e agente, por exemplo, por meio de técnicas recombinantes ou síntese de peptídeos.

Outras modificações do anticorpo ou imunoadesina são contempladas no presente. O anticorpo imunoadesina pode ser ligado, por exemplo, a um dentre uma série de polímeros não proteináceos, tais como polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxiálquilenos ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol.

O anticorpo ou imunoadesina descrito no presente pode também ser formulado na forma de lipossomos. Os lipossomos que contêm o antagonista ou anticorpo são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, tais como conforme descrito em Epstein et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 3688 (1985); Hwang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4030 (1980); Patentes Norte-Americanas nº 4.485.045 e 4.544.545; e WO 97/38731 publicada em 23 de outubro de 1997. Lipossomos com maior tempo de circulação são descritos na Patente Norte-Americana nº 5.013.556.

Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados por meio do método de evaporação de fase reversa com composição de lipídios que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomos são extrudados por meio de filtros com tamanho de

poro definido para gerar lipossomos com o diâmetro desejado. Os fragmentos de Fab' de anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser conjugados aos lipossomos descritos em Martin et al, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) por meio de reação de troca de dissulfetos. Agente quimioterápico é opcionalmente contido no interior do lipossomo. Vide Gabizon et al, *J. National Cancer Inst.* 81 (19): 1484 (1989).

É (são) contemplada(s) modificação(ões) de seqüências de aminoácidos do anticorpo ou imunoadesina. Pode ser desejável, por exemplo, aprimorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo ou imunoadesina. Variantes de seqüências de aminoácidos do anticorpo são preparadas por meio da introdução de mudanças de nucleotídeos apropriadas no ácido nucleico do anticorpo, ou por meio da síntese de peptídeos. Essas modificações incluem, por exemplo, exclusões e/ou inserções e/ou substituições de resíduos nas seqüências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de exclusão, inserção e substituição é feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácidos podem também alterar processos pós-tradução do anticorpo, tais como a mudança do número ou posição de sítios de glicosilação.

Método útil de identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo que são sítios preferidos para mutagênese é denominado "mutagênese de varredura de alanina", conforme descrito por Cunningham e Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo é identificado (por exemplo, resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituído por aminoácido neutro ou negativamente carregado (de maior preferência alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com o antígeno. Esses sítios de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são

refinados em seguida por meio da introdução de outras variantes ou adicionais nos sítios de substituição ou para estes. Desta forma, embora o sítio para introdução de variação de seqüência de aminoácidos seja previamente determinado, a natureza intrínseca da mutação não necessita ser previamente determinada. Para analisar o desempenho de mutação em um dado sítio, por exemplo, varredura de ala ou mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e as variantes de anticorpos expressas são selecionadas para a atividade desejada.

As inserções de seqüências de aminoácidos incluem fusões de terminais carboxila e/ou amino que variam de comprimento de um resíduo até polipeptídeos que contenham cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-seqüenciais de resíduos de aminoácidos isolados ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem anticorpo com resíduo de metionila N-terminal ou o anticorpo fundido a polipeptídeo citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo de uma enzima ou polipeptídeo que aumente a meia vida do anticorpo em soro.

Outro tipo de variante é variante de substituição de aminoácidos. Estas variantes contêm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo substituída por resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese de substituição de anticorpos incluem as regiões hipervariáveis, mas também são contempladas alterações de FR. Substituições conservadoras são exibidas na Tabela 2 sob o título "substituições preferidas". Caso essas substituições resultem em mudança da atividade biológica, mudanças mais substanciais, denominadas "exemplos de substituições" na Tabela 2 ou conforme descrito adicionalmente abaixo com referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos são selecionados.

TABELA 2

Resíduo original	Exemplos de substituições	Substituições preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

Modificações substanciais das propriedades biológicas do anticorpo são atingidas por meio da seleção de substituições que difiram significativamente de efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, tal como na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio desejado; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as similaridades das propriedades das suas cadeias laterais (em A. L. Lehninger, *Biochemistry*, segunda edição, págs. 73-75, Worth Publishers, Nova Iorque (1975)):

(1) não polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares não carregados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

(1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação de cadeias: gly, pro; e

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Substituições não conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo pode também ser substituído, geralmente com serina, para aumentar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar retícula

aberrante. Por outro lado, ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo para aumentar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo for fragmento de anticorpo, tal como fragmento de Fv).

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de anticorpo parental. Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas aprimoradas com relação ao anticorpo parental do qual é (são) gerada(s). Uma forma conveniente de geração dessas variantes de substituição é a maturação por afinidade utilizando exibição de fagos. Resumidamente, diversos sítios de regiões hipervariáveis (por exemplo, seis a sete sítios) sofrem mutações para gerar todas as substituições amino possíveis em cada sítio. As variantes de anticorpos geradas desta forma são exibidas de maneira monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos na forma de fusões para o produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As variantes exibidas por fago são selecionadas em seguida de acordo com a sua atividade biológica (tal como afinidade de ligação), da forma descrita no presente. A fim de identificar possíveis sítios de regiões hipervariáveis para modificação, mutagênese de varredura de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de regiões hipervariáveis que contribuem significativamente para a ligação de antígenos. Alternativa ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar estrutura de cristal do complexo de antígeno e anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Esses resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas no presente. Após a geração dessas variantes, o quadro de variantes é submetido a seleção conforme descrito no presente e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais testes relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Outro tipo de variante de aminoácidos do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo ou imunoadesina. Essa alteração inclui a exclusão de uma ou mais porções carboidrato encontradas no anticorpo e/ou a adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estejam presentes no anticorpo ou imunoadesina.

A glicosilação de polipeptídeos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligado designa a ligação da porção de carboidrato à cadeia lateral de resíduo de asparagina. As seqüências de tripeptídeos asparagino-X-serina e asparagino-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido, com exceção de prolina, são as seqüências de reconhecimento para a ligação enzimática da porção carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Desta forma, a presença de qualquer dessas seqüências de tripeptídeos em polipeptídeo cria potencial sítio de glicosilação. Glicosilação O-ligada designa a ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a ácido hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora também possam ser utilizadas 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de sítios de glicosilação é convenientemente conseguida por meio da alteração da seqüência de aminoácidos, de forma que contenha uma ou mais das seqüências de tripeptídeos descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração pode também ser feita por meio da adição de um ou mais resíduos de serina ou treonina à seqüência da proteína original, ou substituição por ele (para sítios de glicosilação O-ligados).

Quando a proteína compreender região Fc, o carboidrato a ela ligado pode ser alterado. Anticorpos com estrutura de carboidrato madura que não contém fucose ligada a região Fc do anticorpo, por exemplo, são descritos no Pedido de Patente Norte-Americano nº US 2003/0157108 A1, Presta, L. Vide também US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) com referência a composição de anticorpos CD20. Anticorpos com N-

acetilglucosamina (GlcNAc) bisseccionada no carboidrato ligado a região Fc do anticorpo são indicados em WO 03/011878, Jean-Mairet et al, e na Patente Norte-Americana nº 6.602.684, Umana et al. Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacarídeo ligado a região Fc do anticorpo são
 5 relatados em WO 97/30087, Patel et al. Vide também WO 98/58964 (Raju, S.) e WO 99/22764 (Raju, S.) referentes a anticorpos com carboidrato alterado ligado à sua região Fc.

A variante de glicosilação preferida do presente compreende região Fc, em que estrutura de carboidrato ligada à região Fc não contém
 10 fucose. Essas variantes possuem função ADCC aprimorada. Opcionalmente, a região Fc compreende ainda uma ou mais substituições de aminoácidos que aumentam ainda mais ADCC, tais como substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração de resíduos Eu). Exemplos de publicações relativas a anticorpos “desfucosilados” ou “com deficiência de fucose” incluem:
 15 Pedido de Patente Norte-Americano nº US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 00/61739A1; WO01/29246A1; US2003/0115614A1; US2002/0164328A1; US2004/0093621A1; US2004/0132140A1; US2004/0110704A1; US2004/0110282A1; US2004/0109865A1; WO03/085119A1; WO03/084570A1; WO2005/035778; WO2005/035586 (que descreve a inibição por RNA (RNAi)
 20 de fucosilação); Okazaki et al, *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); e Yamane-Ohnuki et al, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Exemplos de linhagens celulares que produzem anticorpos defucosilados incluem células CHO de Lec13 com deficiência na fucosilação de proteínas (Ripka et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); Pedido de Patente Norte-Americano nº US
 25 2003/0157108, Presta, L.; e WO 2004/056312 A1, Adams et al, especialmente no Exemplo 11) e linhagens de células knockout, tais como gene alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, células CHO knockout (Yamane-Ohnuki et al, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam variantes da sequência de aminoácidos são preparadas por meio de uma série de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas sem limitar-se ao isolamento a partir de fonte natural (no caso de variantes de seqüências de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação por meio de mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou dirigida para sítio), mutagênese de PCR e mutagênese de conjunto de uma variante preparada anteriormente ou versão não variante.

Pode ser desejável modificar o anticorpo ou imunoadesina de acordo com a presente invenção com relação à função efetora, por exemplo, de forma a aumentar a citotoxicidade mediada por célula dependente de antígenos (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) do anticorpo. Isso pode ser atingido por meio da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos em região Fc de anticorpo. Alternativa ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, de forma a permitir a formação de ligações de dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico gerado desta forma pode possuir capacidade de internalização aprimorada e/ou morte celular mediada por complemento aprimorada e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Vide Caron et al, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B., *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aprimorada podem também ser preparados utilizando reticulantes heterobifuncionais, conforme descrito em Wolff et al, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser construído anticorpo que possui regiões Fc duplas e pode, portanto, apresentar capacidades de ADCC e lise de complemento aprimoradas. Vide Stevenson et al, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

WO 00/42072 (Presta, L.) descreve anticorpos com função ADCC aprimorada na presença de células efetoras humanas, em que os anticorpos compreendem substituições de aminoácidos na sua região Fc. Preferencialmente, o anticorpo com ADCC aprimorado compreende

substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração Eu de resíduos). Preferencialmente, a região Fc alterada é região Fc de IgG1 humana que compreende ou consiste de substituições em uma, duas ou três destas posições. Estas substituições são opcionalmente combinadas com substituição(ões) que aumenta(m) a ligação de C1q e/ou CDC.

Anticorpos com ligação de C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) são descritos em WO 99/51642, Patente Norte-Americana nº 6.194.551 B1, Patente Norte-Americana nº 6.242.195 B1, Patente Norte-Americana nº 6.528.624 B1 e Patente Norte-Americana nº 6.538.124 (Idusogie et al). Os anticorpos compreendem substituição de aminoácidos em uma ou mais das posições de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 e/ou 334 da sua região Fc (numeração Eu de resíduos). Substituição de um ou mais resíduos nas posições 326, 327, 333 e/ou 334 pode aumentar a ligação de C1q e/ou a função de CDC.

Para aumentar a meia vida do anticorpo em soro, pode-se incorporar epítipo de ligação de receptor de salvados ao anticorpo (especialmente fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na Patente Norte-Americana nº 5.739.277. Da forma utilizada no presente, a expressão "epítipo de ligação de receptor de salvados" designa epítipo da região Fc de molécula de IgG (tal como IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da meia vida em soro *in vivo* da molécula de IgG.

Anticorpos com ligação aprimorada ao receptor Fc neonatal (FcRn) e meias-vidas maiores são descritos em WO 00/42072 (Presta, L.) e US 2005/0014934 A1 (Hinton et al). Estes anticorpos compreendem região Fc com uma ou mais substituições que aumentam a ligação da região Fc a FcRn. A região Fc pode conter por exemplo, substituições em uma ou mais das suas posições 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ou 434 (numeração Eu de resíduos). A variante de

anticorpo que compreende região Fc preferida com ligação de FcRn aprimorada compreende substituições de aminoácidos em uma, duas ou três posições 307, 380 e 434 da sua região Fc (numeração Eu de resíduos).

Anticorpos elaborados com três ou mais (preferencialmente quatro) sítios de ligação de antígenos funcionais também são contemplados (Pedido de Patente Norte-Americano nº US 2002/0004587 A1, Miller et al).

FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Formulações terapêuticas dos anticorpos ou imunoadesinas utilizados de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenagem por meio da mistura de anticorpo ou imunoadesina que apresente o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são atóxicos para pacientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos, antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabens tais como metil ou propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de dez resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contraíons formadores de sais tais como sódio; complexos metálicos (tais como

complexos de Zn e proteína); e/ou tensoativos não iônicos, tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG).

Exemplos de formulações de anticorpos anti-CD20 são descritos em WO 98/56418. Essa publicação descreve formulação líquida de múltiplas doses que compreende 40 mg/ml de rituximab, 25 mM de acetato, 150 mM de trehalose, álcool benzílico a 0,9%, polissorbato 20 a 0,02% sob pH 5,0 que possui vida mínima de armazenagem de dois anos a 2-8 °C. Outra formulação anti-CD20 de interesse compreende 10 mg/ml de rituximab em 9,0 mg/ml de cloreto de sódio, 7,35 mg/ml de di-hidrato citrato de sódio, 0,7 mg/ml de polissorbato 80 e Água Estéril para Injeção, pH 6,5.

Formulações liofilizadas adaptadas para administração subcutânea são descritas na Patente Norte-Americana nº 6.267.958 (Andya et al). Essas formulações liofilizadas podem ser reconstituídas com diluente apropriado até alta concentração de proteína e a formulação reconstituída pode ser administrada por via subcutânea ao mamífero a ser tratado no presente.

Formas cristalizadas do anticorpo ou imunoadesina também são contempladas. Vide, por exemplo, US 2002/0136719 A1 (Shenoy et al).

A formulação do presente pode também conter mais de um composto ativo conforme o necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não se prejudiquem entre si. Pode ser desejável, por exemplo, fornecer adicionalmente segundo medicamento, tal como os descritos no Capítulo Tratamento abaixo. O tipo e as quantidades eficazes desses outros agentes dependem, por exemplo, da quantidade de anticorpo presente na formulação, do tipo de doença autoimune sendo tratada e de parâmetros clínicos dos pacientes. Estes são geralmente empregados nas mesmas dosagens e com vias de administração conforme utilizado acima no presente ou cerca de 1 a 99% das dosagens empregadas até aqui.

Os ingredientes ativos podem também ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por métodos de aglutinação ou por polimerização interfacial, tais como microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (tais como lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

Podem ser fabricadas preparações de liberação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes com liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como póli(2-hidroxietilmetacrilato) ou álcool (poli)vinílico, polilactidas (Patente Norte-Americana nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ e tila, etileno vinil acetato não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tais como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido póli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis.

TRATAMENTO DE PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES

A presente invenção fornece método de tratamento de paciente com doença autoimune que compreende: administração de anticorpo terapêutico, imunoadesina ou outra droga biológica ao paciente para tratar doença autoimune; obtenção de amostra biológica do paciente; purificação por afinidade de

imunoglobulinas a partir da amostra biológica; e submissão das imunoglobulinas purificadas a teste de anticorpo neutralizante. Preferencialmente, a amostra biológica é soro e pode haver-se concluído que contém interferência que interfere com o desempenho de teste de anticorpo neutralizante.

5 Várias doenças autoimunes que podem ser tratadas no presente são descritas acima no capítulo de definições. Exemplos de doenças autoimunes preferidas incluem disfunções reumatológicas autoimunes (tais como artrite reumatóide (RA), síndrome de Sjogren, escleroderma, lúpus tal como SLE e nefrite do lúpus, polimiosite/dermatomiosite, crioglobulinemia, síndrome de anticorpos anti-
10 fosfolipídios, artrite psoriática), disfunções do fígado e gastrointestinais autoimunes (tais como doenças intestinais inflamatórias (por exemplo, colite ulcerativa e mal de Crohn), gastrite autoimune e anemia perniciosa, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária e doença celíaca), vasculite (vasculite associada a ANCA, vasculite de Churg-Strauss, granulomatose de Wegener e
15 poliartrite), doenças neurológicas autoimunes (tais como esclerose múltipla, síndrome de opsoclonus mioclonus, miastenia grave, neuromielite ótica, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, polineuropatias autoimunes), doenças renais (glomerulonefrite, síndrome de Goodpasture, mal de Berger), disfunções dermatológicas autoimunes (psoríase, urticária, pêfigo vulgar, penfigóide bolhosa,
20 eritematose do lúpus cutâneo), disfunções hematológicas (púrpura trombocitopênica, púrpura trombocitopênica trombótica, púrpura pós-transfusão, anemia hemolítica autoimune), arteriosclerose, uveíte, doenças auditivas autoimunes tais como doença do ouvido interno e perda de audição, mal de Behcet, síndrome de Raynaud, transplante de órgãos e disfunções endócrinas autoimunes
25 (doenças autoimunes relacionadas à diabetes, mal de Addison, doença da tireóide autoimune (mal de Graves, tireoidite)). Indicações autoimunes de maior preferência incluem artrite reumatóide (RA), SLE, colite ulcerativa, vasculite associada a ANCA, lúpus, esclerose múltipla, síndrome de Sjogren, mal de Graves, IDDM, anemia

perniciosa, tireoidite e glomerulonefrite, em que RA e SLE são as de preferência superior para os propósitos do presente.

O anticorpo terapêutico preferido no presente é anticorpo que se liga a marcador da superfície de células B, de maior preferência anticorpo CD20, de preferência superior anticorpo CD20 quimérico, humanizado ou humano, de maior preferência rituximab, 2H7 humanizado, anticorpo CD20 humano 2F2 (HuMax-CD20) (Genmab), anticorpo A20 humanizado (Immunomedics), conjugado de auristatina E anti-CD20 (Seattle Genetics), anti-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope), terapia de MAb anti-CD20 (EpiCyte) ou anticorpo anti-CD20 TRU 015 (Trubion) etc. É de preferência ainda maior rituximab ou 2H7 humanizado.

Outros anticorpos terapêuticos ou imunoadesinas de interesse no presente incluem: rituximab, 2H7 humanizado, anticorpo CD20 humano 2F2 (HuMax-CD20), anticorpo A20 humanizado ou IMMU-106, TRU 015, anticorpo fator de necrose tumoral (TNF)- α , infliximab, CDP571, MAK-195, adalimumab, fragmento de anticorpo TNF- γ pegilado, CDP-870, anticorpo policlonal anti-TNF- α , PassTNF, anticorpo de integrina, efalizumab, natalizumab, anticorpo BAFF, anticorpo BR3, anticorpo receptor de BAFF, anticorpo Blys, belimumab, anticorpo CD37, TRU 016, anticorpo CD22, epratuzumab, anticorpo Abiogen CD22, CMC 544, combotox, BL22, LIF 226, anticorpo VEGF, anticorpo receptor de VEGF, bevacizumab, anticorpo anti-HER, trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, anticorpo anti-IgE, omalizumab, anticorpo IL-21, anticorpo anti-células B Impheron, 1D09C3, anticorpo Lym-1, oncolym, ISF 154, gomilixima, anticorpo receptor de IL-6, atlizumab, anticorpo IL-15, HuMax-IL-15, anticorpo receptor de quemoquina, anticorpo CCR2, MLN1202, anticorpo anti-complemento, anticorpo C5, eculizuma, formulação oral de imunoglobulina humana, IgPO, anticorpo IL-12, ABT-874, teneliximab, anticorpo CD40, S2C6 humanizado, TNX 100, anticorpo CD52, campath-1H e anticorpo $\forall\forall\exists 3$.

Quando o anticorpo for anticorpo CD20, tal como Rituximab ou 2H7 humanizado, o anticorpo pode ser dosado como 1 g x 2, 375 mg/m² x 4 etc. Preferencialmente, duas ou mais exposições de anticorpos são fornecidas, por exemplo, a cada cerca de seis meses ou a cada cerca de doze meses.

5 O anticorpo é administrado por qualquer meio apropriado, que inclui administração parenteral, local, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal e/ou intralesional. As infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal ou subcutânea. Também é contemplada administração intratecal (vide, por
10 exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2002/0009444, Grillo-Lopez, A., com referência ao fornecimento intratecal de anticorpo CD20). Preferencialmente, a dosagem é fornecida por via intravenosa ou subcutânea.

Embora o anticorpo terapêutico, imunoadesina ou outro bioilógico possa ser administrado na forma de agente isolado para tratar a doença
15 autoimune, geralmente, o anticorpo terapêutico ou imunoadesina será combinado com um ou mais segundo(s) medicamento(s). Para RA, por exemplo, e outras doenças autoimunes, o anticorpo, imunoadesina ou outra droga biológica é preferencialmente combinado com qualquer uma ou mais drogas imunossupressivas, agentes quimioterápicos, antagonistas de BAFF,
20 antagonistas ou anticorpos de integrina e/ou citocinas relacionadas no capítulo de definições acima; qualquer uma ou mais drogas antirreumáticas modificadoras de doenças (DMARDs), tais como hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, azatioprina, D-penicilamina, Gold (oral), Gold (intramuscular), minociclina, ciclosporina, imunoadsorção de
25 proteína A de estafilococo; imunoglobulina intravenosa (IVIG); drogas antiinflamatórias não esteroidais (NSAIDs); glucocorticóide (por exemplo, por meio de injeção nas juntas); corticoesteróide (tal como metilprednisolona e/ou prednisona); folato; antagonista de fator anti-necrose tumoral (TNF), tal como

etanercept/ENBREL®, infliximab/REMICADE®, D2E7 (Knoll) ou CDP-870 (Celltech); antagonista IL-1R (tal como Kineret); antagonista 1L-10 (tal como Ilodecakin); modulador da coagulação sangüínea (tal como WinRho); antagonista de IL-6/anti-TNF (CBP 1011); antagonista de CD40 (tal como IDEC 131); antagonista receptor de Ig-Fc (MDX33); imunomodulador (tal como talidomida ou ImmuDyn); anticorpo anti-CD5 (tal como H5g1.1); inibidor de macrófagos (tal como MDX 33); bloqueador coestimulante (tal como BMS 188667 ou Tolerimab); inibidor de complementos (tal como h5G1.1, 3E10 ou anticorpo fator de aceleração anti-deterioração (DAF); antagonista de IL-2 (zxSMART); inibidor de EGFR (vide definição acima); inibidor da tirosino quinase (vide definição acima); agente antiangiogênico (tal como anticorpo de VEGF como bevacizumab); anticorpos CD22 tais como LL2 ou epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluindo epratuzumab Y-90 (Juweid et al, *Cancer Res.* 55 (23 Supl.): 5899s-5907s (1995)), anticorpo CD22 da Abiogen (Abiogen, Itália), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) e LymphoScan Tc99 (Immunomedics); anticorpo EpCAM, tal como 17-1A (PANOREX®); anticorpo α VEGFR3 (tal como VITAXIN®; Medimmune); anticorpo CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticorpo IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticorpo anti-células B (Impheron); MAb direcionador de células B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticorpo Lym-1 Y-90 (USC); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticorpo BAFF (tal como WO 03/33658); anticorpo receptor de BAFF (tal como WO 02/24909); anticorpo BR3; anticorpo Blys tal como belimumab; LYMPHOSTAT-B®; Oncolym anti-Lym-1 (USC/Peregrine); ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticorpo receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticorpo IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticorpo receptor de quemoquina, tal como anticorpo CCR2 (por exemplo, MLN1202; Millienium); anticorpo anti-complemento, tal como anticorpo C5 (por exemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulação oral de

imunoglobulina humana (tal como IgPO; Protein Therapeutics); anticorpo IL-12 tal
 como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818); vacina de células B; DN-
 BAFF (Xencor); CRx-119 (CombinatoRx); antagonista BAFF da Amgen; Pentostatin
 (Pfizer); IC-485 (ICOS); antagonista de quemoquina tal como T-487 (Tularik) ou
 5 Reticulose (AVR-118); SCO-323 (SCIOS); antagonista de integrina 683699,
 Tanabe, NGD-2001-1 (Neurogen); SCIO-469 (SCIOS); BIRB-796 (Boehringer
 Ingelheim); VX702, VX850 (Vertex); antagonista Leucotrieno B-4 (tal como
 amelubunt, BIL-284; BI); modulador de microtúbulos (Paxceed; Angiotech); inibidor
 de protease (MBS561392; BMS); AGIX-4207 (Atherogenics); ISIS-104838
 10 (ISIS/Elan); MFG-IRAP (Univ. Pitt.); IL-1 Trap (RGN-303; Regeneron/Novartis);
 oprelvequina (Wyeth); everolimo (Certican; Novartis); Amevive (Biogen Idec); ORG-
 39141 (Organon); FK-506 (Fujisawa); antagonista de IL-2 (tacrolimo; Fujisawa); etc.

O segundo medicamento pode ser administrado com a exposição
 inicial e/ou exposições posteriores do anticorpo terapêutico ou imunoadesina,
 15 em que essa administração combinada inclui a coadministração, utilizando
 formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e
 administração consecutiva em qualquer ordem, em que há preferencialmente
 período de tempo em que ambos (ou todos) os agentes ativos exercem
 simultaneamente suas atividades biológicas.

20 Além da administração do anticorpo ou imunoadesina diretamente
 ao paciente, o presente pedido contempla a administração de anticorpos ou
 imunoadesinas por meio de terapia genética. Essa administração de ácido
 nucleico codificador do anticorpo é englobada pela expressão administração de
 “quantidade eficaz” de anticorpo. Vide, por exemplo, WO 96/07321 publicada
 25 em 14 de março de 1996, referente à utilização de terapia genética, para gerar
 anticorpos intracelulares.

Existem duas abordagens principais para a obtenção do ácido
 nucléico (opcionalmente contido em vetor) nas células do paciente: *in vivo* e *ex*

vivo. Para fornecimento *in vivo*, o ácido nucleico é injetado diretamente no paciente, normalmente no sítio em que é necessário o anticorpo. Para tratamento *ex vivo*, as células do paciente são removidas, o ácido nucléico é introduzido nessas células isoladas e as células modificadas são administradas ao paciente diretamente ou, por exemplo, encapsuladas em membranas porosas que são implantadas no paciente (vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 4.892.538 e 5.238.187). Existe uma série de técnicas disponíveis para a introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo da transferência ou não do ácido nucleico para células cultivadas *in vitro* ou *in vivo* nas células do hospedeiro desejado. Técnicas apropriadas de transferência de ácido nucleico para células de mamíferos *in vitro* incluem o uso de lipossomos, eletroporação, microinjeção, fusão celular, DEAE-dextran, método de precipitação de fosfato de cálcio etc. Vetor comumente utilizado para fornecimento *ex vivo* do gene é retrovírus.

As técnicas de transferência de ácido nucleico *in vivo* atualmente preferidas incluem transfecção com vetores virais (tais como adenovírus, vírus I simplex da Herpes ou vírus adenoassociado) e sistemas com base em lipídios (lipídios úteis para transferência mediada por lipídios do gene são, por exemplo, DOTMA, DOPE e DC-Chol). Em algumas situações, é desejável fornecer à fonte de ácido nucleico um agente que se dirija às células alvo, tal como anticorpo específico para proteína de membrana da superfície celular ou a célula alvo, ligante para receptor sobre a célula alvo etc. Ao empregar-se lipossomos, proteínas que se ligam a proteína de membrana da superfície celular associada a endocitose podem ser utilizadas para dirigir e/ou facilitar a absorção, por exemplo, de proteínas de capsida ou seus fragmentos trópicos para um tipo de célula específico, anticorpos para proteínas que sofrem internalização na ciclicação e proteínas que dirigem localização intracelular e aumentam a meia vida intracelular. O método de endocitose mediada por

receptor é descrito, por exemplo, por Wu et al, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987); e Wagner et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 3410-3414 (1990). Para análise dos protocolos de terapia genética e marcação genética atualmente conhecidos, vide Anderson et al, *Science* 256: 808-813 (1992). Vide também WO 93/25673 e as referências ali mencionadas.

KITS DE DIAGNÓSTICO

A presente invenção também fornece kit de diagnóstico ou artigo industrializado, para uso com o método de tratamento prévio do presente. O kit de diagnóstico pode compreender qualquer um ou mais dos seguintes: material de referência de antagonista/anticorpo/droga (tal como material de referência de rituximab); anticorpo neutralizante de controle positivo (preferencialmente cabra de macaco cyno); coluna Proteína A + G (tal como Proteína A/G); reagente de deslipidação; tampão(ões) de purificação por afinidade de imunoglobulina (tal como tampões de ligação, eluição e neutralização); soro de complemento; diluente de teste para células; manual de instruções ou literatura; ampola de células congeladas (tais como células WIL2); reagente marcador de células (tal como CELL TITER GLO®) etc.

O kit de diagnóstico pode compreender, por exemplo, (a) reagente de deslipidação; (b) tampões (tais como tampões de ligação e de eluição) para purificação por afinidade de imunoglobulinas; e (c) manual de instruções que instrui o usuário do kit de diagnóstico a utilizar o kit para o tratamento prévio de amostra biológica de paciente com doença autoimune antes da condução de bioteste com base em células (tal como teste de anticorpo neutralizante) sobre a amostra (tal como para evitar o problema de interferência de soro). Opcionalmente, a amostra biológica foi tratada com droga, tal como anticorpo terapêutico ou imunoadesina.

O kit de diagnóstico pode ainda compreender opcionalmente qualquer um ou mais dos seguintes: material de referência da droga, anticorpo

neutralizante controle positivo, soro de complemento, diluente de teste para células, reagente marcador celular etc.

Detalhes adicionais da presente invenção são ilustrados pelo Exemplo não limitador que se segue. As descrições de todas as citações no relatório descritivo são expressamente incorporadas ao presente como referência.

EXEMPLO 1

TESTE DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES COM TRATAMENTO PRÉVIO DE SORO

Este exemplo refere-se ao desenvolvimento de teste de anticorpo neutralizante para anticorpo CD20, rituximab, em indicações autoimunes.

Rituximab é anticorpo monoclonal quimérico de camundongo humano que reconhece a molécula CD20 humana sobre células B e esgota células B por meio de funções efetoras de anticorpos. Rituximab é aprovado nos Estados Unidos e na Europa para determinar linfoma não de Hodgkin (NHL) recidivante indolente e está sendo desenvolvido para indicações autoimunes, que incluem artrite reumatóide (RA) e eritematose do lúpus sistêmico (SLE), entre outras.

Determinação da atividade de anticorpo neutralizante (NAb) soropositivo contra Rituximab foi desenvolvida com base no teste de potência, teste de citotoxicidade celular dependente de complemento (CDC). Neste teste, o Rituximab é incubado com fonte padronizada de complemento de soro humano e linhagem de células de linfócitos B alvo, WIL2-S, por duas horas. Após duas horas, a quantidade de células mortas por Rituximab-CDC é medida em proporção à quantidade de células vivas remanescentes.

REAGENTES

Reagente de deslipidação: Absorvente PHM-L LIPOSORB®, Calbiochem, cat524371

Proteína A/G imobilizada IMMUNOPURE®: Pierce, cat 20422

Colunas de polipropileno de 5 ml: Pierce, cat 29922

Tampão de eluição: HCl em ddH₂O estéril, pH 2,1

Tampão de neutralização: 20X PBS, A410 (sem $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$), pH 6,5, HyClone cat SH3A648.01

Tampão bloqueador: 1% BSA em PBS

BSA: 7,5% BSA, Fração V, cultura celular testada, Sigma cat. A8412

PBS: Prep. Meios GNE B5, código A0829

Concentrador CENTRICON-30®: tamanho de 2 ml, Amicon cat. 4209

Centrífuga para deslipidação: Centrífuga EPPENDORF® 5415C

Centrífuga para células e concentração: Beckman GS-6R

Células WIL2-S (ATCC CRL-8885)

Meio de crescimento: RPMI 1640, 2 mM L-glutamina, 10% FBS, gentamicina

Diluyente de Teste (AD): RPMI 1640, 20 mM HEPES, 0,1% BSA, 25 µg/mL gentamicina.

Meio de escassez: 10% Meio de Crescimento em AD

Complemento: soro complementar humano, Quidel parte A112, lote 3MO174

Padrão Rituximab: material de referência C2B81298-2, 9,8 mg/ml.

Padrão NAb Rituximab: Cyno anti-Rituxan pAb (lote 44082-81), 0,5 mg/mL

Rituximab NAb controle: NHS_{pool} contendo NAb (título baixo e alto, lote 44083-48)

CELLTITER-GLO®: Promega, cat. G7571 (10 x ampolas de 10 ml)

GUAVA® VIACOUNT®: GUAVA® Inc. 4000-0040

Placas de TC brancas com 96 cavidades, fundo transparente com tampa: Corning costar 3610

Leitor Molecular Devices SOFTMAX® Pro Lmax

Concentrador Pierce iCON®, 7 ml tamanho, cat-89886 (alternativa para CENRICON-30®)

Pierce IMMUNOPURE® Proteína A Plus (cat 22811) (alternativa para Proteína A/G)

Pierce IMMUNOPURE® Proteína G Plus imobilizada (cat 22851) (alternativa para Proteína A/G)

5 **PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO PRÉVIO DE AMOSTRA**

1. Deslipidar o soro. Adicionar 200 µl de solução LIPOSORB® (reconstituída em PBS, de acordo com as instruções do fabricante) a 0,25 ml de soro em tubo de polipropileno de 1,5 ml siliconado. Turbilhonar por 45 segundos e centrifugar por dez minutos a 4500 rpm (1600 x g). Remover e
10 diluir o sobrenadante em 1 ml de PBS em tubo de polipropileno de 1,5 ml siliconado. (É aceitável se algum LIPOSORB® for conduzido para a amostra; ele não obstrui a coluna.)

2. Preparar coluna separada de 0,5 ml de Proteína A/G para cada amostra de paciente e controles. Adicionar 1 ml de calda de Proteína A/G a
15 coluna de 5 ml e medir a altura do leito para garantir volume de leito de 0,5 ml.

3. Caso o gel tenha sido utilizado anteriormente, conduzir 5 ml de tampão de eluição através da coluna para limpar esferas de coluna. O número de vezes em que a coluna pode ser reutilizada não foi determinado.

4. Equilibrar a coluna utilizando 2 x 5 ml de PBS.

20 5. Aplicar os 1,25 ml de soro diluído à coluna. Recolher o fluxo em tubo de polipropileno de 1,5 ml siliconado e reaplicar duas vezes.

6. Lavar coluna utilizando 3 x 5 ml de PBS.

7. Eluir anticorpo com 4 ml de tampão de eluição em tubo FALCON® de 15 ml que contém 0,2 ml de tampão de neutralização.

25 8. Bloquear 2 ml de concentrador CENTRICON-30® adicionando 0,5 ml de tampão bloqueador e centrifugando o concentrador por dez minutos a 3000 rpm (1000 x g). Descartar qualquer tampão bloqueador no topo ou fundo do concentrador.

9. Concentrar os eluentes neutralizados até atingir-se volume final de 0,25 ml. Caso a amostra seja excessivamente concentrada, utilizar o fluxo de CENTRICON-30® para diluição de volta para 0,25 ml. Utilizar tubo de polipropileno de 1,5 ml siliconado para medir o volume final até a marca de 0,25 ml.

10. Armazenar o concentrado a -70 °C até que esteja pronto para teste no teste de CDC de neutralização.

PROCEDIMENTO DE TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO

O teste de anticorpos neutralizantes do presente é baseado no descrito em US 2005/0032130 A1 (Beresini e Song), publicada em dez de fevereiro de 2005. O teste foi modificado, entretanto, nos aspectos a seguir: A amostra biológica (ou seja, soro) é agora soro previamente tratado; CELLTITER-GLO® é agora a leitura de teste em vez de ALAMAR BLUE® (resazurin); anticorpo controle utilizado é preparação purificada de Proteína A de macaco cynomolgus (HER2 adsorvida), não anti-Rituximab de cabra; e tampões, volumes, complemento, controles, efeitos em matriz de soro, análise de dados e interpretação foram alterados conforme descrito abaixo.

1. No dia antes do teste, semear 8×10^6 células em 20 ml de meio de escassez ($0,4 \times 10^6$ células/ml).

2. Preparar 100 (CDC_{max}), 0,4 (CDC_{NAb}) e 0 (CDC_{zero}) µg/ml de Rituximab.

100 µg/ml: 10,2 µL Rituximab Padrão a 1 ml AD

20 µg/ml: 150 µl 100 µg/ml Rituximab em 600 µl AD

0,4 µg/ml: 100 µl 20 µg/ml Rituximab em 4,9 ml AD

0 µg/ml: AD isolado

3. Adicionar 25 µl a cavidades de teste conforme exibido abaixo (Tabela 3).

TABELA 3**DISPOSIÇÃO EM PLACAS DE CONCENTRAÇÕES DE RITUXIMAB**

	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0	0	0	0	100	
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0	0	0	0	100	

4. Adicionar 25 µl cada em duplicata de controle negativo, baixo controle e amostras conforme exibido na Tabela 4. A disposição de
- 5 placas atual possui espaço para 24 amostras. Pode ser possível utilizar mais da placa, mas isso não foi testado.

TABELA 4**DISPOSIÇÃO EM PLACAS DE CONTROLES E AMOSTRAS**

	NEG	NEG	LO	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	
	NEG	NEG	LO	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	
	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	
	RA8	RA9	RA10	RA11	RA12	RA13	RA14	RA15	RA16	RA17	
	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24	RA25	NEG	NEG	
	RA18	RA19	RA20	RA21	RA22	RA23	RA24	RA25	NEG	NEG	

5. Incubar com suave agitação à temperatura ambiente por
- 10 pelo menos duas horas para permitir a ligação e neutralização de Rituximab por anticorpos purificados do soro.

6. Descongelar soro de complemento à temperatura ambiente (RT) e colocar sobre gelo em seguida.

7. Remover células WIL2-S do frasco, lavando os lados inferiores do frasco, em tubo falcon de 50 ml. Remover 10 µl de suspensão celular e adicionar 190 µl de VIACOUNT®. Após dois minutos, contar as células e registrar #/ml (diluição 20X) e percentual de viabilidade. Alternativamente, as células podem ser contadas utilizando hemocitômetro.

8. Centrifugar células a 1200 rpm (150 x g), por oito minutos. Decantar meios e suspender novamente as células em 1 ml de AD. Preparar 10 a 20 ml de células WIL2-S em AD a $0,25 \times 10^6$ /ml para o teste.

9. Adicionar 50 µl de complemento a cada cavidade.

10. Adicionar 50 µl de $0,25 \times 10^6$ /ml de células WIL2-S preparadas na etapa 9 a cada cavidade.

11. Agitar placa para mistura por um minuto à temperatura ambiente. Incubar por duas horas a 37 °C/5% CO₂. Nos últimos dez minutos, trazer a placa para a temperatura ambiente.

12. Permitir que o reagente CELLTITER-GLO® chegue à temperatura ambiente. Adicionar 100 µl a cada cavidade. Tampão CELLTITER-GLO® e substrato são armazenados a -20 °C. Os dois componentes podem ser colocados para descongelar a 4-8 °C por uma noite e, no dia do teste, misturados e deixados sobre a bancada por trinta a 45 minutos antes do uso. Reagente misturado adicional pode ser armazenado a -20 °C por pelo menos um mês.

13. Agitar placa para mistura por dez minutos à temperatura ambiente.

14. Ler luminescência sobre leitor Molecular Devices LMAX®, utilizando tempo de integração de um segundo, sem subtração de padrão.

ANÁLISE DE DADOS

1. Calcular os valores médios das réplicas de teste para todas as amostras e controles. Não utilizar valores caso o percentual de CV do meio seja > 25%.

5 2. Calcular o ponto de corte conforme segue:
(Valor de Controle Negativo Médio CELLTITER-GLO® a 0,4 µg/ml de Rituximab) x 1,03

Ponto de corte do teste é definido como o nível de resposta do teste acima do qual amostra é definida como sendo positiva e abaixo do qual é definida como sendo negativa. O ponto de corte é determinado estatisticamente a partir do nível de fundo não específico no teste, conforme descrito em Mire-Sluis et al, *Journal of Immunological Methods* 289: 1-16 (2004)). Neste teste, o fator de ponto de corte de 1,03 foi determinado por meio de teste de dez soros nativos individuais de RA ao longo de três dias e representa aumento de 3% sobre a resposta de controle negativo entre testes. Os dez soros individuais de RA foram selecionados a partir de população de cem indivíduos, para refletir toda a série de interferências de soro e efeitos não específicos. O procedimento de tratamento prévio de soro, realizado como parte de cada teste, normalizou as reações de amostras e permitiu a aplicação do baixo fator de ponto de corte de 1,03. Utilizando o fator de ponto de corte de 1,03, todos os soros de RA nativos de Rituximab seriam definidos como negativos, enquanto 1 µg/ml de pAb anti-Rituximab de macaco cynomolgus ou 0,25 µg/ml de pAb anti-Rituximab de cabra seriam definidos como positivos.

3. Examinar valores médios de amostra e relatar de acordo com os critérios a seguir:

25 Caso valor médio de amostra $\leq$ ponto de corte, relatar amostra como negativa.

Caso valor médio de amostra $\geq$ ponto de corte, relatar amostra como positiva.

4. O teste é válido caso a razão do controle baixo caia > ponto de corte e se houver queda de dez vezes no sinal entre as respostas de teste de 0 µg/ml e 100 µg/ml de Rituximab.

5. No momento, as amostras são relatadas como positivas ou
5 negativas, com base no ponto de corte entre testes. No futuro, pode-se desejar calcular os valores de títulos de amostras. "Título" é o recíproco da diluição mais alta da amostra com resultados positivos de testes no método. É prática comum expressar título como o logaritmo comum da diluição mais alta da amostra com resultados positivos de testes no método. (Mire-Sluis et al,
10 *Journal of Immunological Methods* 289: 1-16 (2004)). Caso isso fosse feito, controle com alto título também seria incluído.

Interpolação de Título

O título de amostra é definido como $\log_{10}$ do fator de diluição da amostra que resulta em resposta de teste equivalente ao ponto de corte no
15 teste. Portanto, caso diluição 1/100 de amostra resulte em sinal no teste equivalente ao ponto de corte, o título seria $\log_{10}100$ ou 2,00. Amostra que necessita de diluição 1/1000 receberia título de 3,00. Caso a resposta de ponto de corte caia entre duas respostas de diluição de amostra (o que geralmente ocorre), o título é calculado utilizando fórmula para solucionar ponto
20 desconhecido sobre linha em eixo X-Y, desde que todos os pontos Y sejam conhecidos ("unidades de sinal") e dois dos pontos X sejam conhecidos ("unidades de diluição").

É utilizada a fórmula a seguir:

a = sinal da amostra positiva ou controle acima do ponto de corte
25 b = sinal da amostra positiva ou controle abaixo do ponto de corte
c = sinal do ponto de corte
d = diluição da amostra positiva ou sinal de controle acima do
ponto de corte

e = diluição da amostra positiva ou sinal de controle abaixo do ponto de corte

Para calcular o título:

$$\text{Título} = \log (a-c) \cdot (e-d) + d (a-b)$$

6. O teste é válido caso a razão do baixo controle caia $> 1,03$ e o título de alto controle $> 2,0$.

7. As amostras são relatadas como valor de título de atividade neutralizante. Caso a resposta de amostra a $0 \mu\text{g/ml}$ de Rituximab indique interferência de teste, relatar dados como "não determinados devido a substâncias interferentes".

PASSAGEM DE CÉLULAS WIL2-S

1. O teste de neutralização de Rituximab-CDC utiliza a linhagem de células de linfoblastas B WIL2-S imortais como célula alvo. Esta linhagem celular idealmente passa após atingir densidade de $1-2 \times 10^6$ células/ml. Para manter as células, a nova densidade de semeadura deverá dirigir-se a $0,04-0,3 \times 10^6$ células/ml em meios de crescimento. Para preparar teste de CDC, as células são semeadas em densidade de $0,4 \times 10^6$ células/ml em diluente de teste contendo 10% de meios de crescimento. As células podem ser passadas pelo menos até P31. Idealmente, as células deverão ser mantidas em densidade celular de $0,25$ a $2,5 \times 10^6$ células/ml.

TABELA 5

SEMEADURA DE CÉLULAS WIL2-S PARA PASSAGEM

Número de dias antes da repassagem	Número de células introduzidas por 20 ml de meios de crescimento
2	6×10^6
3	1.6×10^6
4	8×10^5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de anticorpo neutralizante de CDC Rituximab é ilustrado esquematicamente na Fig. 4. A Fig. 5 demonstra que a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de Rituximab pode ser neutralizada nos domínios Fab e Fc. Rituximab media CDC de forma dependente de dosagem, em que a lise celular máxima ocorre em concentração de 5 µg/ml (dados de controle exibidos na forma de círculos). A fim de testar a capacidade deste teste de detectar anticorpos neutralizantes, Rituximab foi previamente incubado com anticorpos policlonais anti-Fc γ humano de cabra (dados exibidos como losangos) ou anti-Rituximab de cabra (específico de CDR; dados exibidos como quadrados). Após duas horas, adicionou-se complemento de soro humano normal e 12.500 células. Após duas horas, o número de células vivas foi medido utilizando CELLTITER GLO®. Na presença de anticorpos anti-CDR ou Fc, a potência da atividade de Rituximab-CDC foi reduzida, indicada por alterações nas curvas de reação à dosagem à direita. Conforme indicado pelas setas, por exemplo, o percentual de células vivas restantes a 1 µg/ml de Rituximab é maior em amostras previamente incubadas com anti-CDR de cabra (100%), seguidas por amostras previamente incubadas com anti-Fc γ de cabra (70%) em comparação com o controle (40%).

A primeira etapa na alteração de potência para neutralização do formato de teste é testar a capacidade do teste para tolerar soro nativo de droga não tratado. Testes iniciais do ensaio de Rituximab-CDC na presença de soro humano normal demonstraram desempenho dependente de dosagem equivalente entre vinte indivíduos machos e fêmeas. Dentre a população alvo do teste de NAb, pacientes com artrite reumatóide (RA), entretanto, o teste não foi confiável, demonstrando reações celulares de CDC e Rituximab altamente variáveis entre os indivíduos. Em alguns indivíduos, a adição de soro nativo ao teste inibiu completamente a capacidade de mediação de CDC por Rituximab.

A Fig. 6 exibe tolerância de soro no Teste de Rituximab-CDC. O teste de Rituximab-CDC foi realizado para determinar a sua capacidade de tolerar soro nativo de droga não tratado. Testes iniciais do ensaio na presença de soro humano normal demonstraram desempenho dependente de dosagem equivalente entre dez indivíduos machos e fêmeas (plotagem à esquerda). Dentre a população alvo do teste de NAb, pacientes com artrite reumatóide (RA), entretanto, o teste não foi confiável, demonstrando reações celulares de CDC e Rituxan altamente variáveis entre os indivíduos (plotagem à direita). Em alguns indivíduos, a adição de soro nativo ao teste inibiu completamente a capacidade de mediação de CDC por Rituxan (tal como dados individuais exibidos como losangos).

A falta de especificidade e variabilidade de tecido de potência de Rituximab na presença de soro de RA, a chamada “interferência de soro”, gerou a adição de etapa de tratamento prévio em soro para “limpar” a amostra antes da sua submissão ao teste de Rituximab CDC.

Os métodos testados para tratamento prévio de soro foram desenvolvidos com níveis crescentes de manipulação.

Em primeiro lugar, embora a interferência pudesse ser minimizada por meio do aumento da diluição de amostra mínima (até pelo menos 1/80), a sensibilidade do teste foi muito comprometida ($> 5 \mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti-Rituximab).

Em segundo lugar, várias leituras de teste alternativas foram comparadas. Neste teste, a quantidade de CDC causada por Rituximab pôde ser medida pela quantidade de células vivas restantes ou a quantidade de células mortas. Células vivas são tipicamente medidas por leitura metabólica, tais como o indicador redox ALAMAR BLUE® ou o indicador ATP, CELLTITER GLO®. Células mortas podem ser medidas por meio da liberação de conteúdo citoplasmático, seja endógeno (tal como lactose desidrogenase) ou por tintura previamente carregada (tal como calceína). Conceitualmente, caso reagente

gerasse leitura de teste após dez minutos (tal como CELLTITER GLO®), em comparação com dezesseis horas (tal como ALAMAR BLUE®), haveria menos tempo para interferência não específica do soro com o metabolismo celular. Alternativamente, caso reagente fosse adicionado de forma exógena e, portanto, não conectado ao metabolismo celular (tal como calceína), pode haver menos interferência.

A Fig. 7 representa leituras de teste alternativas para o teste de Rituximab-CDC. A quantidade de lise celular causada por Rituximab-CDC pôde ser medida pela quantidade de células vivas restantes ou a quantidade de células mortas. Células vivas são tipicamente medidas por leitura metabólica, tais como o indicador redox ALAMAR BLUE® ou o indicador ATP, CELLTITER GLO®. Células mortas podem ser medidas por meio da liberação de conteúdo citoplasmático, seja endógeno (tal como lactose desidrogenase) ou por tintura previamente carregada (tal como calceína). ALAMAR BLUE® (dados exibidos em x) e CELLTITER GLO® (dados exibidos em círculos) demonstraram perfis de Rituximab-CDC similares, com faixa dinâmica aprimorada evidente para CELLTITER GLO®. Calceína (dados exibidos em quadrados) também foi capaz de medir Rituximab-CDC, embora com menos sensibilidade e menor faixa dinâmica. Lactose desidrogenase (dados exibidos em losangos) não foi indicador sensível de Rituximab-CDC.

A Fig. 8 é comparação de interferência de soro de RA no teste de Rituximab-CDC ao utilizar leituras diferentes. Em esforço para reduzir interferência de soro de artrite reumatóide no teste de Rituximab-CDC, foi testada a tolerância de três leituras de teste de CDC diferentes (vide Fig. 7) para cinco soros de RA individuais. A interferência de soro foi observada com todos os três reagentes de detecção, CELLTITER GLO®, ALAMAR BLUE® (ponto intermediário) e calceína. CELLTITER GLO® foi selecionado como leitura para desenvolvimento de teste futuro, pois exibiu a menor interferência de soro, melhor faixa dinâmica e EC₅₀ de Rituximab mais uniformemente sensível.

Conforme exibido nas Figs. 7 e 8, neste teste, leituras alternativas não solucionaram a interferência de soro de RA, o que sugere que a interferência ocorre no início do teste, durante as duas horas as células são incubadas com Rituximab e soro de complemento padronizado. Infelizmente, testes de MOA funcionais apropriados alternativos para Rituximab ou trajetos alternativos para medição de CDC não são disponíveis.

Terceira linha de abordagem foi a remoção da substância interferente. Dois métodos razoavelmente suaves testados inicialmente incluíram: coluna de dessalinização (coluna NAP-5®, Pharmacia Biotech) para remover moléculas pequenas; e procedimento de deslipidação (PHM-L LIPOSORB® Calbiochem) para remover lipídios do soro. Nenhum método foi capaz de remover a substância interferente. Terceira possibilidade seria a adição de anticorpo inibidor contra citocina interferente ou sua desativação por calor. Entretanto, embora perfis de citocina do soro de RA de paciente não fossem normais, eles não demonstraram correlação entre níveis de citocina específicos e interferência de teste. Forma bruta de precipitar preferencialmente imunoglobulinas totais é “salinizá-las” por meio da adição de sulfato de amônio saturado (SAS) até volume final de 33%. Interferência de amostra ainda era problema após o procedimento de SAS. Por fim, acreditou-se que seria necessário purificar especificamente as imunoglobulinas do soro antes de testar amostras no teste de Rituximab-CDC.

A purificação específica de imunoglobulinas do soro pôde ser conduzida por meio de (a) purificação específica de anticorpos anti-Rituximab; ou (b) purificação específica de imunoglobulinas totais.

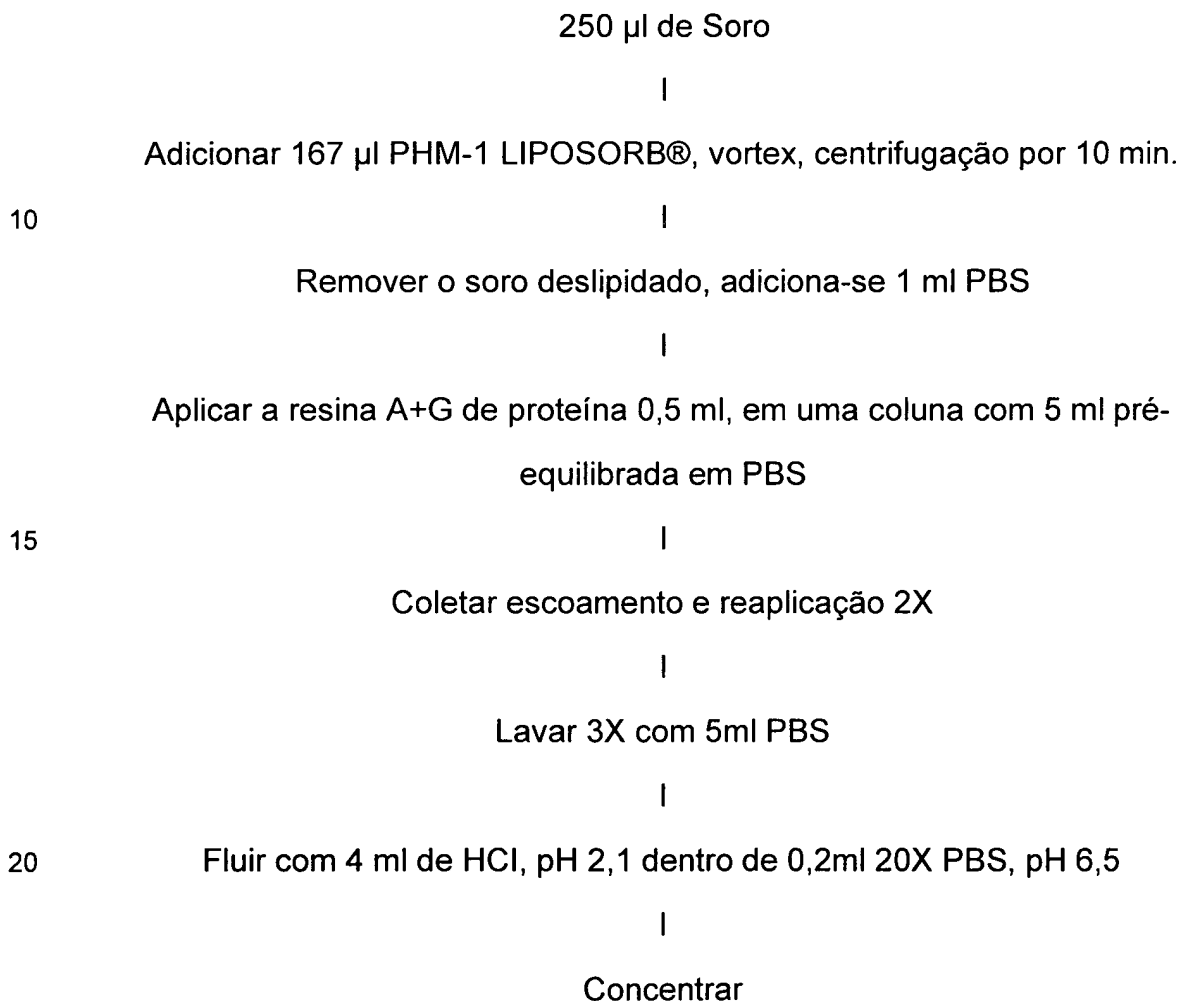
A purificação de anticorpos anti-Rituximab aparentemente foi a abordagem mais direta, com o benefício adicional de captura de todos os isotipos de anticorpos anti-drogas e a remoção de interferência de Rituximab causada por droga terapêutica residual nas amostras de pacientes. Várias

estratégias de purificação por afinidade de Rituximab foram testadas, incluindo: Rituximab-GLY-CPG® (Controlled Pore Glass Products Inc.), Rituximab-BIOMAG® (Bangs Laboratories, Inc.) e Rituximab-EMPORE® (3M Bioanalytical Technologies). Após extensa otimização de parâmetros de acoplamento, bloqueio, ligação e eluição, estes métodos foram suspensos devido à baixa recuperação, particularmente em concentrações de anticorpos específicos de soro de menos de 1 µg/ml (recuperação de menos de 25%).

Método clássico de purificação de imunoglobulinas totais é o uso das proteínas recombinantes de origem microbiana, Proteína A e Proteína G. A Proteína G liga-se fortemente a todos os quatro subtipos de Ig (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), enquanto a Proteína A liga-se fortemente a IgG₁, IgG₂ e IgG₄, fracamente a IgG₃, IgM, IgA e moderadamente a IgE. Combinação das propriedades de Proteína A e Proteína G capturarão todos os isotipos de anticorpos anti-drogas, embora com orientação dirigida aos subtipos IgG_{1,2,4}. Utilizando esta abordagem, a atividade neutralizadora de anticorpos para Rituximab foi equivalente em soro humano normal e soro humano normal previamente tratado no teste CDC. De forma importante, a reação à dosagem da atividade de Rituximab-CDC tornou-se equivalente no soro previamente tratado de indivíduos com RA (indivíduos que demonstram extremos de variação de teste CDC em soro não tratado). A baixa sensibilidade da atividade de neutralização foi determinada como sendo de 0,25 µg/ml e 1 µg/ml (concentração em soro puro) de anticorpos anti-Rituximab de cabra e macaco cynomolgus, respectivamente. Por fim, procedimento utilizando purificação de Proteína A+G antes do teste de amostras de anticorpos anti-Rituximab soropositivos no teste de Rituximab-CDC com base em células foi desenvolvido, otimizado e qualificado. As características de desempenho de teste foram consideradas aceitáveis para teste de caracterização de anticorpos clínicos validados.

A Fig. 9 exibe o procedimento de tratamento prévio de soro utilizado para purificar imunoglobulinas totais a partir da amostra de soro. Este método de purificação de imunoglobulinas no soro total foi desenvolvido para eliminar interferência de soro no teste de Rituximab-CDC. Gráfico de fluxo que resume o procedimento é exibido a seguir.

PROCEDIMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO COM SORO



O procedimento de tratamento prévio de soro superou o problema de interferência. A Fig. 10 exibe o desempenho do teste de Rituximab-CDC antes e depois do procedimento de tratamento prévio de soro. Dentre a população alvo do teste de NAb, pacientes com artrite reumatóide (RA), o teste de Rituximab-CDC não foi confiável, demonstrando reações celulares de CDC e Rituximab altamente variáveis entre os indivíduos (plotagem esquerda). Dez

soros de RA individuais foram testados no ensaio antes (plotagem esquerda) e depois (plotagem direita) de realizar-se o procedimento de tratamento prévio de soro. Tratamento prévio de soro removeu os componentes da matriz interferente e normalizou a reação à dosagem da atividade de Rituxan-CDC entre indivíduos com RA.

Além do procedimento de tratamento prévio de soro, várias melhorias adicionais no teste de anticorpos de neutralização também foram desenvolvidas.

Foi determinada a sensibilidade do teste utilizando diferentes números celulares. A Fig. 11 exibe sensibilidade mais alta do teste de Rituximab-CDC à neutralização em números celulares mais baixos. O teste de potência de Rituximab-CDC, utilizado para liberação de lotes de material, foi adaptado como teste de neutralização. Durante a otimização do teste de neutralização, observou-se maior sensibilidade utilizando números celulares quatro vezes mais baixos (plotagem direita) que os utilizados no teste de potência (plotagem esquerda), mantendo ao mesmo tempo a robustez do teste. Concentrações crescentes de anticorpos policlonais CDR anti-Rituximab de cabra, de 0,125 a 2 $\mu\text{g/ml}$, foram previamente incubadas com Rituximab ao longo de toda a faixa de reação à dosagem do teste. A alteração à direita da curva de reação à dosagem aumentou de forma diretamente proporcional à concentração de pAb dirigida contra Rituximab (plotagens esquerda e direita). A alteração à direita foi maior em números celulares menores (plotagem à direita). Também se observou que, em todas as concentrações de anticorpos neutralizantes, a alteração comparada com o controle não foi linear, alterando até maior ponto em concentrações mais baixas de Rituximab (seções superiores das plotagens esquerda e direita).

A seleção de doses de Rituximab também foi avaliada como meio adicional de aumento da sensibilidade do teste de anticorpos neutralizantes. A Fig. 12 reflete a seleção da concentração de Rituximab utilizada para determinar a

atividade neutralizante. Na avaliação das amostras de paciente, deseja-se relatar a atividade neutralizante em uma única concentração selecionada de Rituximab com relação a ponto de corte. Com base na maior sensibilidade da curva de reação à dosagem de Rituximab à neutralização sob concentrações de Rituximab mais baixas (Fig. 12), a concentração de Rituximab foi testada a 0,2, 0,4 e 0,6 $\mu\text{g/ml}$ com quantidades crescentes de pAb de CDR anti-Rituximab de cabra (de 0,1 a 1 $\mu\text{g/ml}$). Sob concentração de Rituximab de 0,2 $\mu\text{g/ml}$, a atividade de CDC é apenas marginalmente acima da lise celular de fundo na ausência de droga e a neutralização encontra-se abaixo de significado estatístico. Sob concentração de Rituximab de 0,4 $\mu\text{g/ml}$, a atividade de CDC é 25 a 30% acima de lise celular de fundo na ausência de droga e a neutralização é estatisticamente significativa e proporcional à concentração de anticorpos neutralizantes. Aumentos adicionais das concentrações de Rituximab comprometeram a sensibilidade do teste para a detecção de níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes. Conforme indicado, por exemplo, pela estrela acima, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de pAb CDR anti-Rituximab de cabra não neutralizam 0,6 $\mu\text{g/ml}$, bem como 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de Rituximab.

A Fig. 13 exibe o efeito de interferência de droga sobre o teste de Rituximab-CDC neutralizante. O soro de paciente para teste no ensaio de Rituximab-CDC neutralizante pode conter Rituximab terapêutico residual. Caso os níveis de anticorpos neutralizantes sejam insuficientes para desativar biologicamente terapêutico em circulação, a amostra pode contribuir com Rituximab ativo para o teste, resultando em atividade de CDC anormalmente alta. A atividade neutralizante no teste é avaliada contra controles positivos baixos e negativos entre testes. Atividade com teor de CDC anormalmente alto em amostra resultaria em leitura falsa negativa. A plotagem à esquerda demonstra o efeito da adição de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Rituximab (quadrados) à curva normal de reação à dosagem de Rituximab de teste (círculos). A toxicidade de linha base é mais alta e a EC_{50} alterna para concentração aparente mais baixa.

Conforme descrito na plotagem à direita, entretanto, quando a mesma concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Rituximab é adicionada junto com excesso molar de cinco vezes (5 $\mu\text{g/ml}$) de anticorpo policlonal de CDR anti-Rituximab de cabra (quadrados), a toxicidade de linha base retorna ao normal e ainda há anticorpo neutralizante suficiente além de Rituximab para ser como medido positivo no teste (conforme indicado por alteração significativa à direita na curva de reação à dosagem).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> GENENTECH, INC.
KRISTA MCCUTCHEON
AN SONG

<120> TRATAMENTO PRÉVIO DE AMOSTRA BIOLÓGICA DE PACIENTE COM DOENÇA AUTOIMUNE

<130> P2233R1 PCT

<140> PCT/US2006/019576

<141> 19-05-2005

<150> US 60/682,990

<151> 20-05-2005

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro
1				5					10					15

Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser
				20					25					30

Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro
				35					40					45

Trp	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg
				50					55					60

Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75

Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90

Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu
				95					100					105

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15

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

Lys Arg

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 3

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

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 8

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

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 9

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
95 100 105

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 11

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 12

Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 13

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<40.0> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90
Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95					100					105
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
				110					115					120
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
				125					130					135
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
				140					145					150
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
				155					160					165
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
				170					175					180
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
				185					190					195
Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
				200					205					210

Gly Glu Cys

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 14

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

Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	110	115	120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	305	310	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	320	325	330
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	335	340	345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	350	355	360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	365	370	375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	380	385	390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	395	400	405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 15

<211> 213

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
170 175 180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
185 190 195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 452

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	305	310	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	320	325	330
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	335	340	345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	350	355	360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	365	370	375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	380	385	390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	395	400	405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	410	415	420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	425	430	435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	440	445	450

Gly Lys

<210> 17

<211> 451

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 17

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
				20					25					30	
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	
				95					100					105	
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
				110					115					120	
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	
				125					130					135	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
				140					145					150	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
				155					160					165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				170					175					180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				185					190					195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				200					205					210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
				215					220					225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				260					265					270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				275					280					285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				290					295					300	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
				305					310					315	

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência é Sintetizada

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

10

2

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr		50	55	60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser		65	70	75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		80	85	90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg		95	100	105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val		110	115	120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro		125	130	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu		140	145	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		155	160	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		170	175	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		185	190	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		200	205	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		215	220	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr		245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		275	280	285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		290	295	300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His		305	310	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		320	325	330
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys		335	340	345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> Xaa é M ou L

<400> 21
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
 5 10

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> Xaa é S ou A

<400> 22
 Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
 5

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> Xaa é D ou A

<400> 23
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência é Sintetizada

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> Xaa é N, A, Y, W ou D

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> Xaa é S ou R

<400> 24
 Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE TRATAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA, de paciente com doença autoimune com artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico (SLE), caracterizado pelo fato de que o paciente com
5 doença autoimune foi tratado com um anticorpo terapêutico ou imunoadesina compreendendo:

- (a) deslipidação da amostra;
- (b) purificação por afinidade de imunoglobulinas na amostra;
- (c) concentração das imunoglobulinas purificadas; e
- 10 (d) submissão das imunoglobulinas concentradas a teste de atividade biológica com base em células.

2. MÉTODO, conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teste em (d) é teste de anticorpo neutralizante.

3. MÉTODO, conforme a reivindicação 1, caracterizado pelo
15 fato de que a amostra em (a) é amostra de soro.

4. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o paciente possui artrite reumatóide.

5. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o paciente possui lúpus eritematoso sistêmico (SLE).

20 6. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende a purificação de essencialmente todos os isotipos de imunoglobulina.

7. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende purificação por
25 afinidade de Proteína A + G.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a purificação por afinidade da Proteína A + G é repetida por duas ou mais vezes.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a purificação por afinidade da Proteína A + G é repetida por três vezes.

10. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a amostra na etapa (a) compreende interferência.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o paciente com doença autoimune foi tratado com anticorpo terapêutico.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo terapêutico é anticorpo CD20.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o anticorpo terapêutico é rituximab ou 2H7 humanizado.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo terapêutico é selecionado a partir do grupo que consiste de rituximab, 2H7 humanizado, anticorpo CD20 humano 2F2 (HuMax-CD20), anticorpo A20 humanizado ou IMMU-106, TRU 015, anticorpo fator de necrose tumoral (TNF)- α , infliximab, CDP571, MAK-195, adalimumab, fragmento de anticorpo TNF- γ pegilado, CDP-870, anticorpo policlonal anti-TNF- α , PassTNF, anticorpo de integrina, efalizumab, natalizumab, anticorpo BAFF, anticorpo BR3, anticorpo receptor de BAFF, anticorpo Blys, belimumab, anticorpo CD37, TRU 016, anticorpo CD22, epratuzumab, anticorpo Abiogen CD22, CMC 544, combotox, BL22, LIF 226, anticorpo VEGF, anticorpo receptor de VEGF, bevacizumab, ranibizumab, anticorpo anti-HER, trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, anticorpo anti-IgE, omalizumab, anticorpo IL-21, anticorpo anti-células B Impheron, 1D09C3, anticorpo Lym-1, oncolym, ISF 154, gomilixima, anticorpo receptor de IL-6, atlizumab, anticorpo IL-15, HuMax-IL-15, anticorpo receptor de quemoquina, anticorpo CCR2, MLN1202, anticorpo

anti-complemento, anticorpo C5, eculizuma, formulação oral de imunoglobulina humana, IgPO, anticorpo IL-12, ABT-874, teneliximab, anticorpo CD40, S2C6 humanizado, TNX 100, anticorpo CD52, campath-1H e anticorpo $\forall v\exists 3$.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado
5 pelo fato de que o anticorpo terapêutico é anticorpo de integrina.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado
pelo fato de que o anticorpo de integrina é efalizumab ou natalizumab.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo fato de que o paciente com doença autoimune foi tratado com
10 imunoadesina.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado
pelo fato de que a imunoadesina é selecionada a partir do grupo que consiste
de BR3-Ig, imunoadesina TNF- α , etanercept, corpo de peptídeo anti-BAFF,
TACI-Ig, BCMA-Ig, CTLA4-Ig, abatacept e BAFF-R-Ig.

15 19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo fato de que o paciente com doença autoimune foi tratado com anticorpo
fator de necrose tumoral (TNF)- α ou imunoadesina TNF- α .

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado
pelo fato de que o paciente com doença autoimune foi tratado com infliximab,
20 adalimumab, etanercept, CDP-870 ou D2E7.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo fato de que o paciente com doença autoimune foi tratado com droga
selecionada a partir do grupo que consiste de TNF-R solúvel pegilado,
pegsunercept, antagonista receptor de IL-1 (IL-1Ra), anaquira, DN-BAFF e
25 vacina.

22. KIT DE DIAGNÓSTICO, caracterizado pelo fato de que
compreende:

(a) reagente de deslipidação;

- (b) tampões para purificação por afinidade de imunoglobulinas;
- (c) material de referência da droga; e
- (d) manual de instruções que instrui o usuário do kit de diagnóstico a praticar o método conforme definido na reivindicação 1.

5 23. KIT DE DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente qualquer um ou mais dentre: anticorpo neutralizante controle positivo, soro de complemento, diluente de teste para células e reagente marcador celular.

Alinhamento de Seqüência de Domínios Leves Variáveis

	FR1 CDR1	
	10 20 30 40	
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC [RASSSVS-YMH] WYQQKP	
	* * * * *	
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASSSVS-YMH] WYQQKP	
	* * * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQISISNYLA] WYQQKP	
	FR2 CDR2 FR3	
	50 60 70 80	
2H7	GSSPKPWIY [APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA	
	* * *	* * * * *
hu2H7.v16	GKAPKPLIY [APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
	*	* * *
hum KI	GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
	CDR3 FR4	
	90 100	
2H7	EDAATYYC [QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR	
	*	* * *
hu2H7.v16	EDFATYYC [QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR	
	* * * * *	
hum KI	EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR	

Fig. 1A

Alinhamento de Sequência de Domínios Pesados Variáveis

	FR1 CDR1	
	10 20 30 40	
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS [GYTFTSYNMH] WVKQT	
	*** ** * * * * *	* *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GYTFTSYNMH] WVRQA	
		* * * *
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA	
	FR2 CDR2 FR3	
	50 a 60 70 80	
2H7	PRQGLEWIG [AIYPGNGDTSYNQKFKG] KATLTVDKSSSTAYM	
	** *	** * * * *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AIYPGNGDTSYNQKFKG] RFTISVDKSKNTLYL	
	* * * * *	* *
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLYL	
	CDR3 FR4	
	abc 90 100abcde 110	
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR [VVYYSNSYWFYFDV] WGTGTTVTVSS	
	** * *	*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR [VVYYSNSYWFYFDV] WGQGTTLVTVSS	
	***** * *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLY---DY] WGQGTTLVTVSS	

Fig. 1B

Alinhamento de Cadeia Leve

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	
hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

Fig. 2

Alinhamento de Cadeia Pesada

hu2H7.v16	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	

hu2H7.v511		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
hu2H7.v16	37	52a	82abc
		VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	

hu2H7.v511		VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	
hu2H7.v16	83	100abcde	113
		RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS	

hu2H7.v511		RAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGTLLTVSS	
hu2H7.v16	118	ASTKGPSVFPLAPS	

hu2H7.v511		ASTKGPSVFPLAPS	
hu2H7.v16	132	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	

hu2H7.v511		SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	
hu2H7.v16	182	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	

hu2H7.v511		LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
hu2H7.v16	232	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	

hu2H7.v511		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
hu2H7.v16	282	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	

hu2H7.v511		VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
hu2H7.v16	332	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
		* *****	
hu2H7.v511		IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
hu2H7.v16	382	ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA	

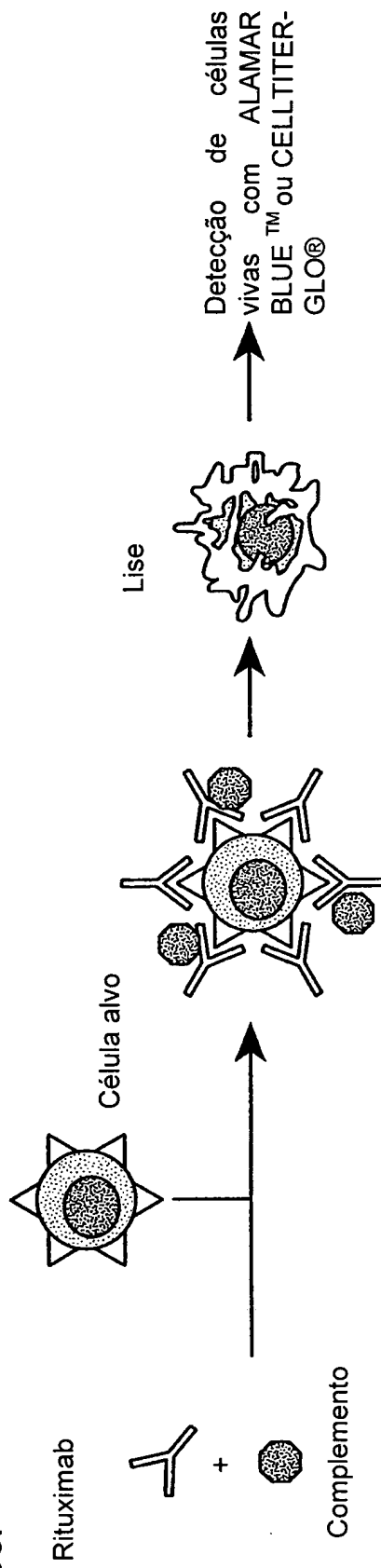
hu2H7.v511		ESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA	
hu2H7.v16	432	447	
		LHNHYTQKSLSLSPGK	

hu2H7.v511		LHNHYTQKSLSLSPGK	

Fig. 3

CDC: Citotoxicidade Dependente de Complemento como um teste de Ab Neutralizante

CDC:



CDC – Ab Neutralizante

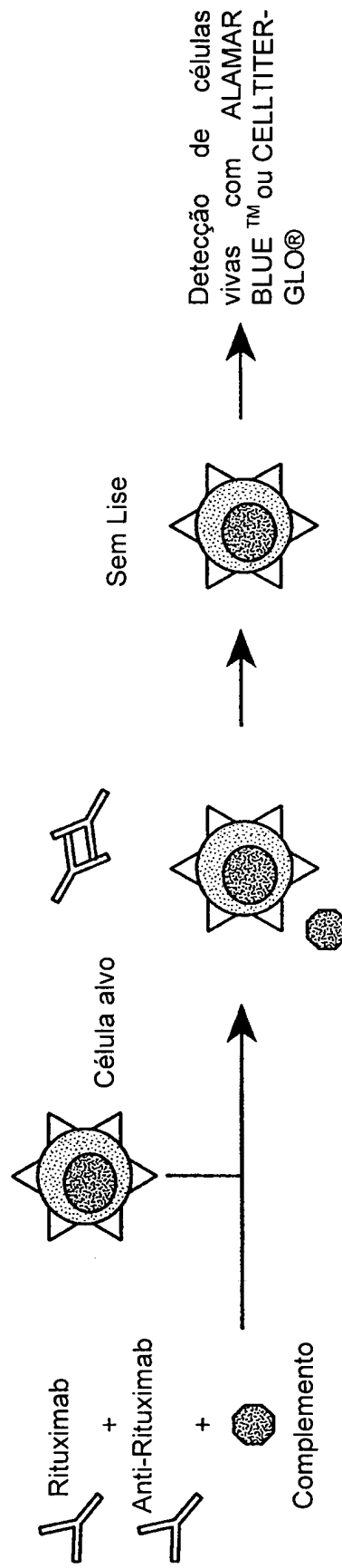


Fig. 4

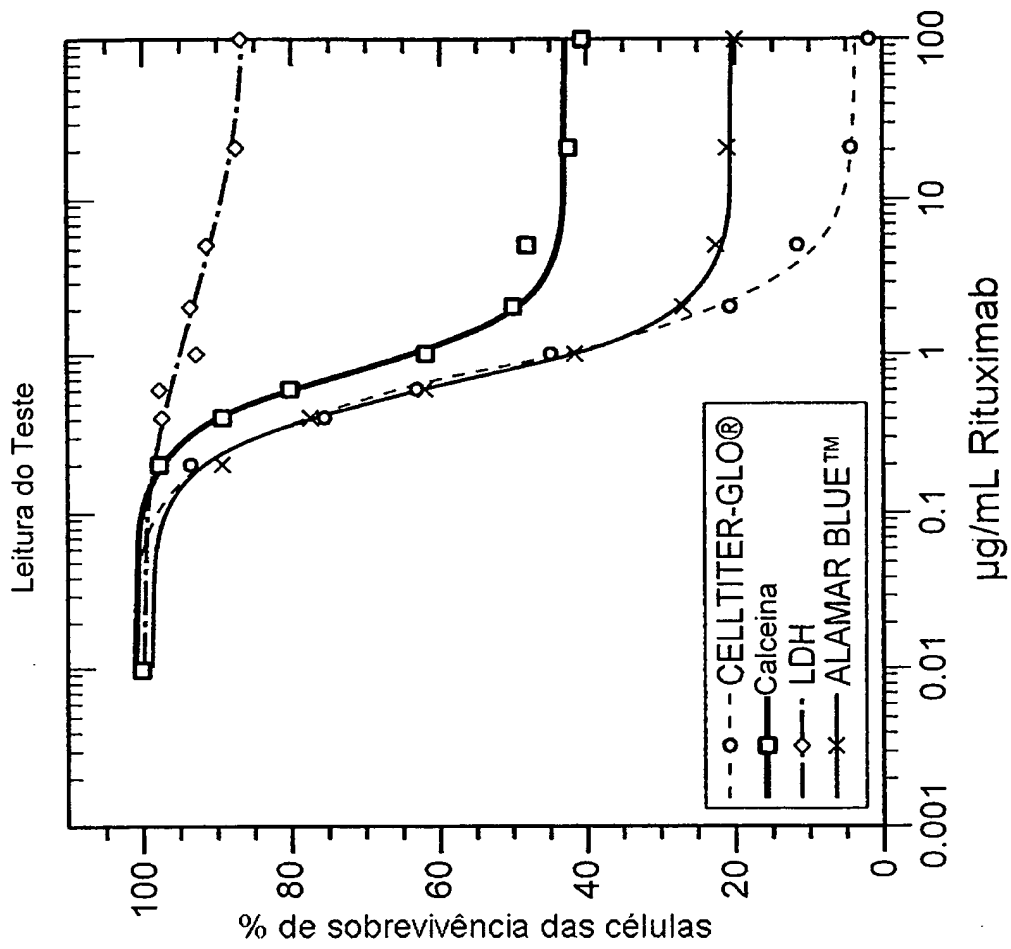


Fig. 7

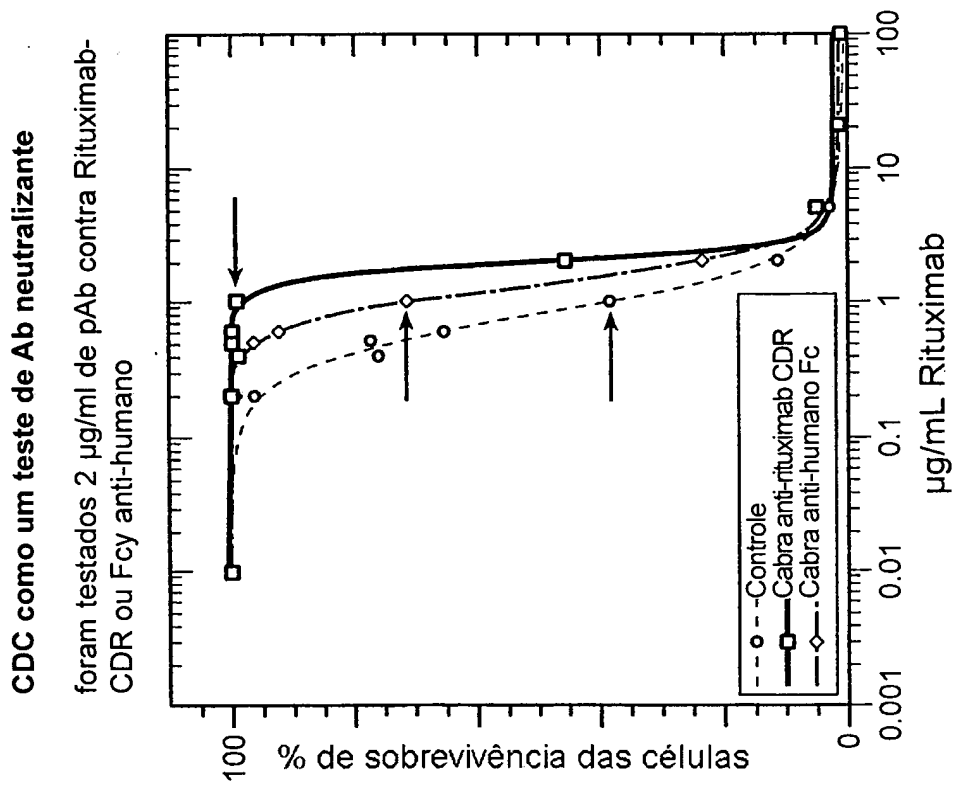


Fig. 5

Teste CDC Nab: tolerância ao soro

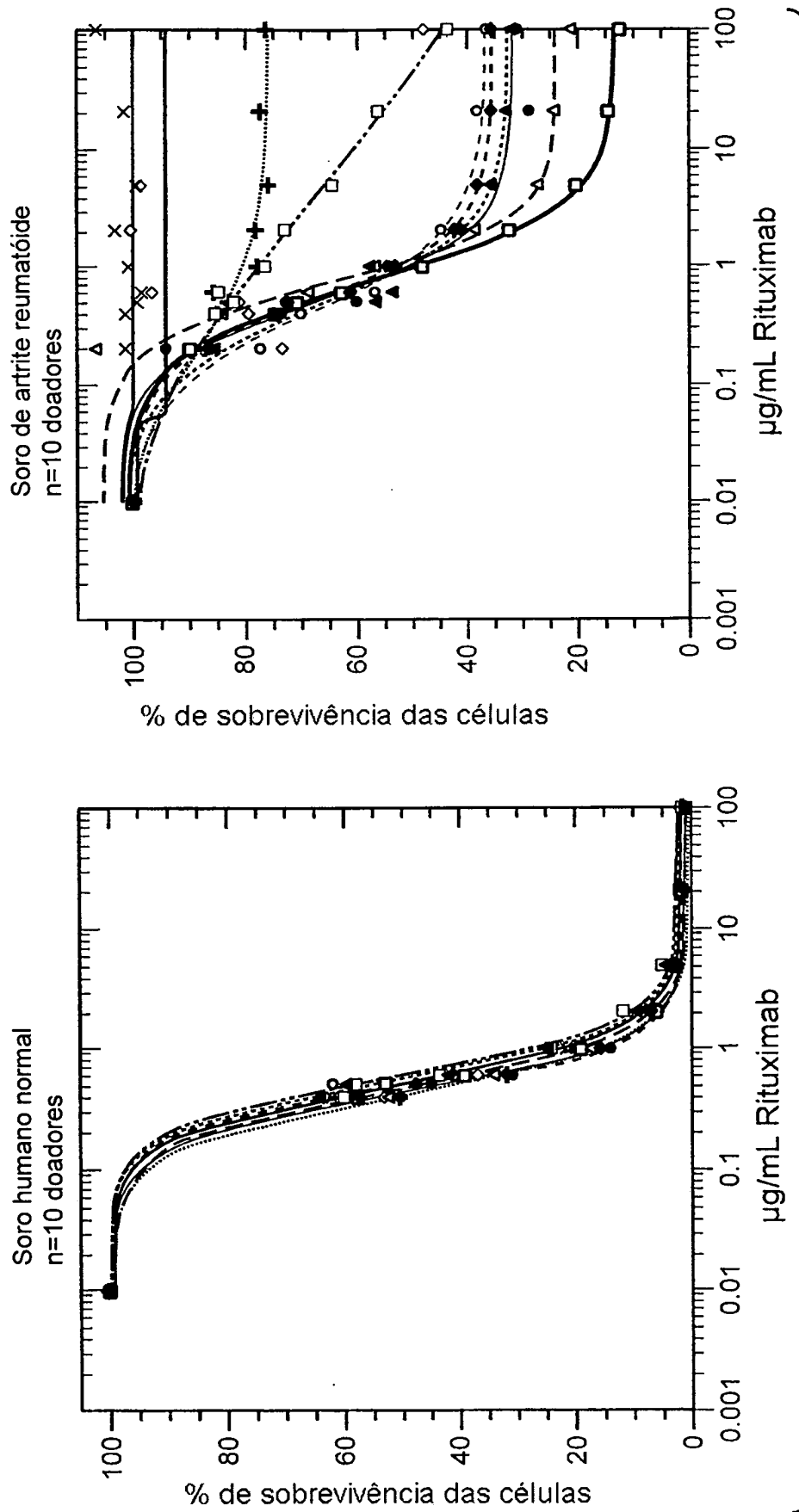


Fig. 6

Interferência do soro de RA
ALAMAR BLUE™ vs. CELLTITER-GLO®

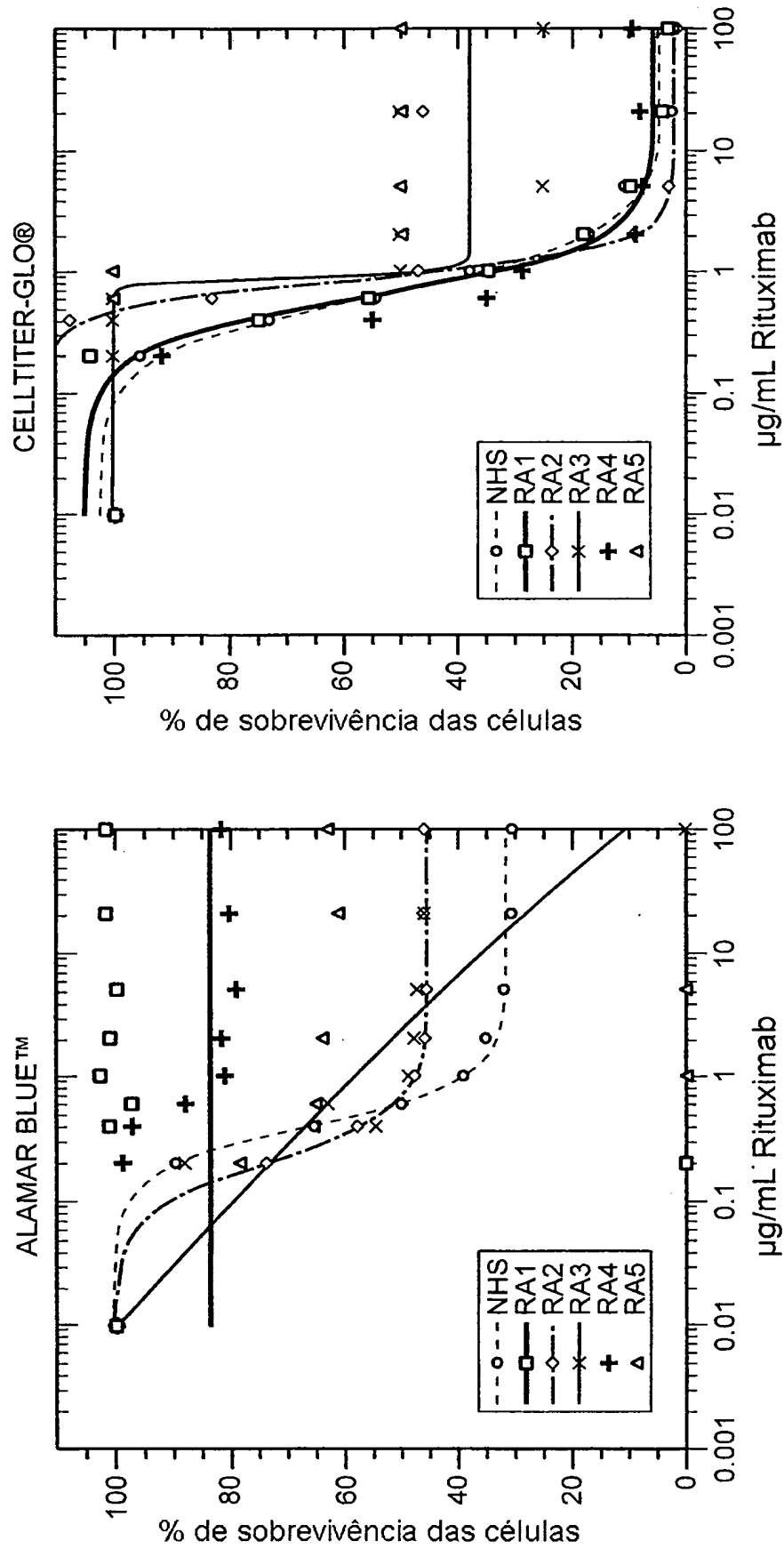
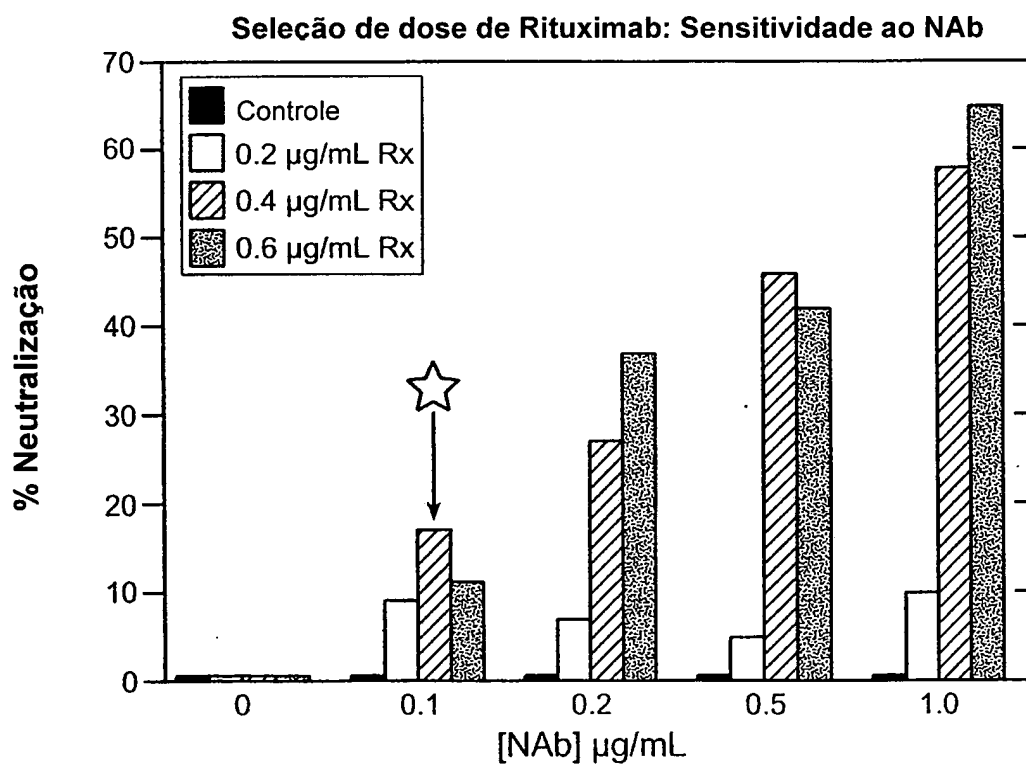
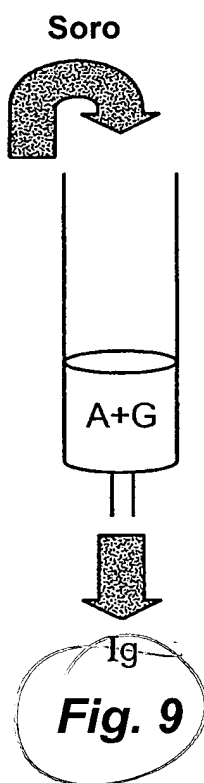
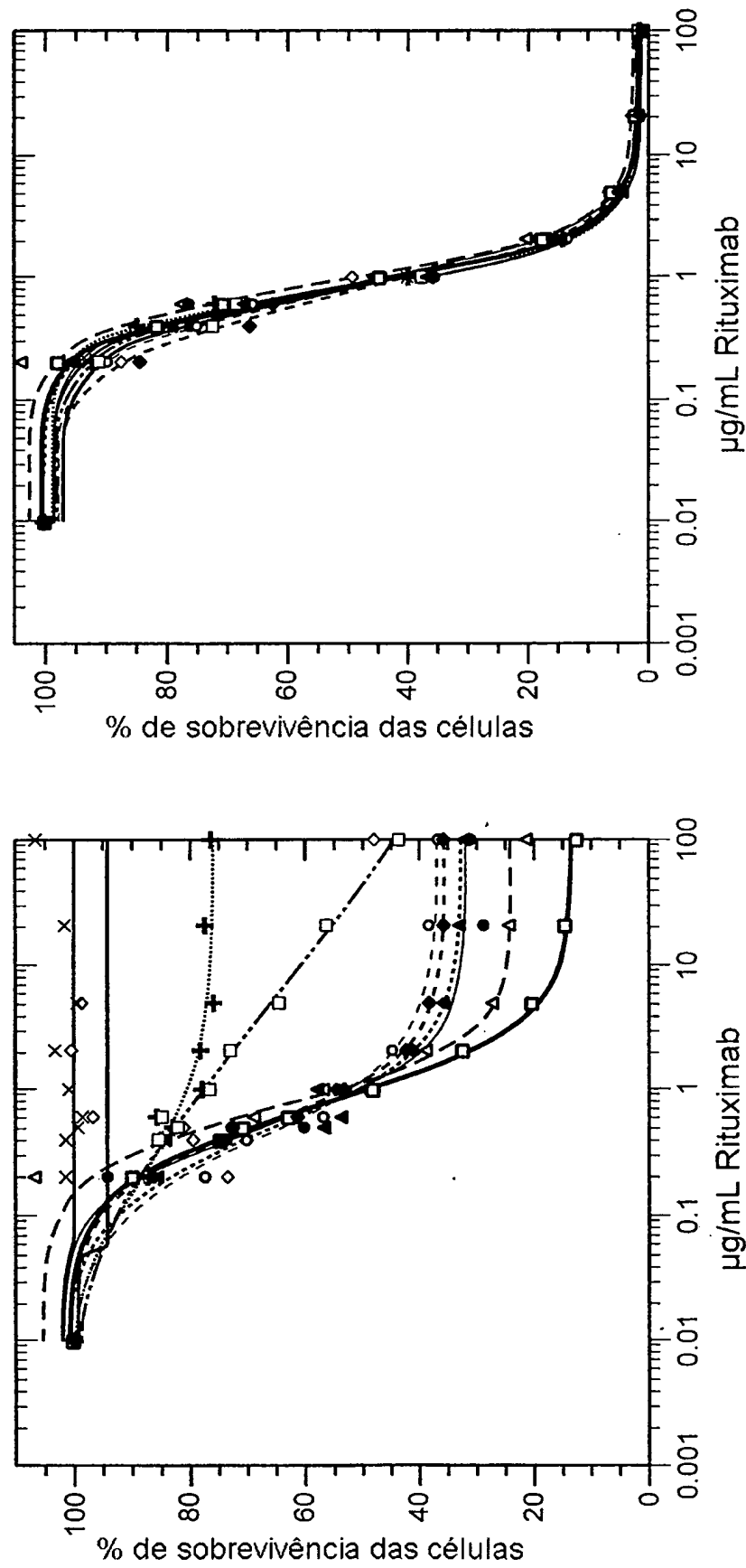


Fig. 8

**Fig. 12**

Pré-tratamento com soro Autoimune

Soro de Artrite Reumatóide, n=10

**Fig. 10**

Número de Células

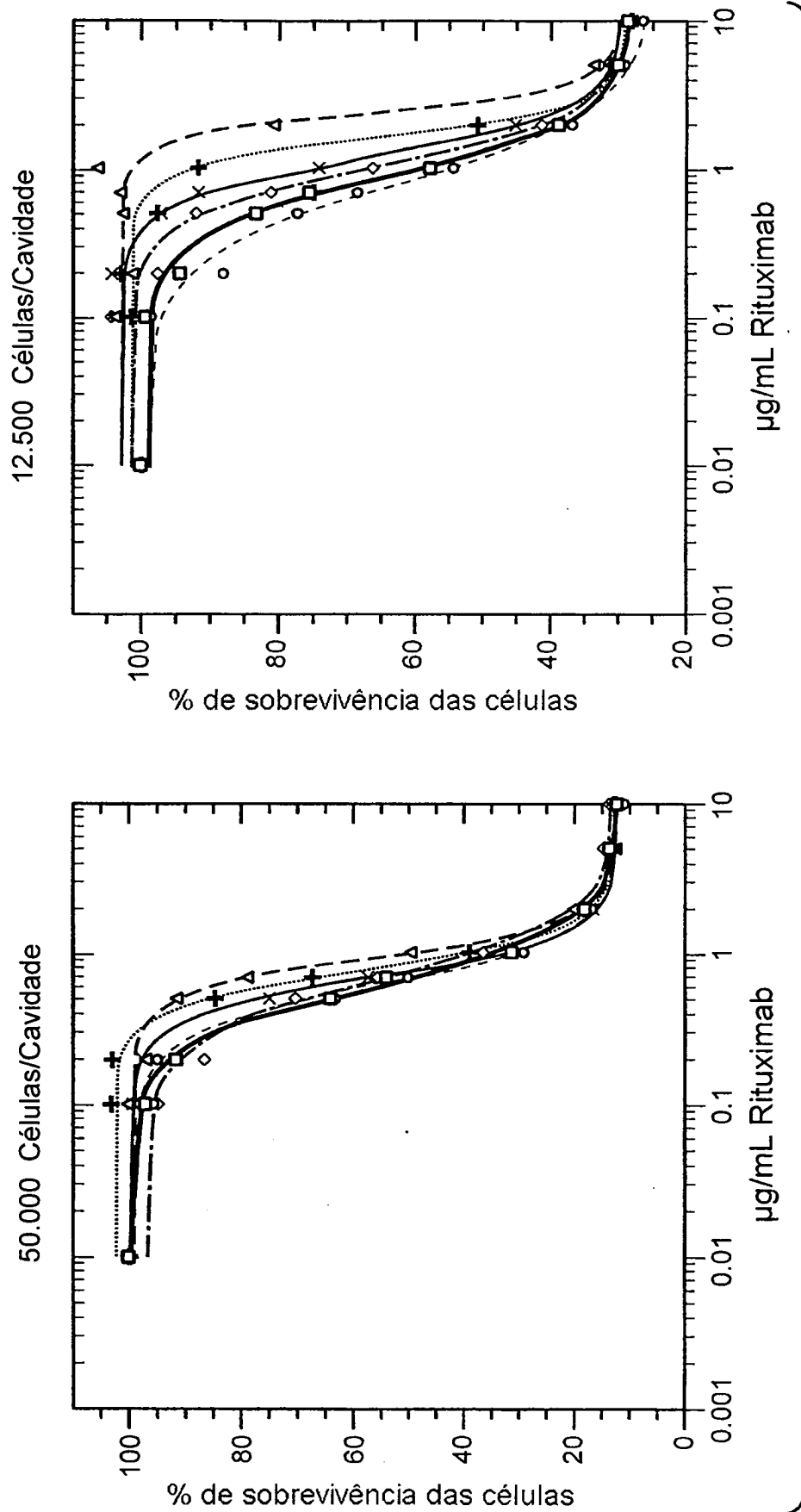


Fig. 11

Considerações do teste NAb: Interferência da Droga

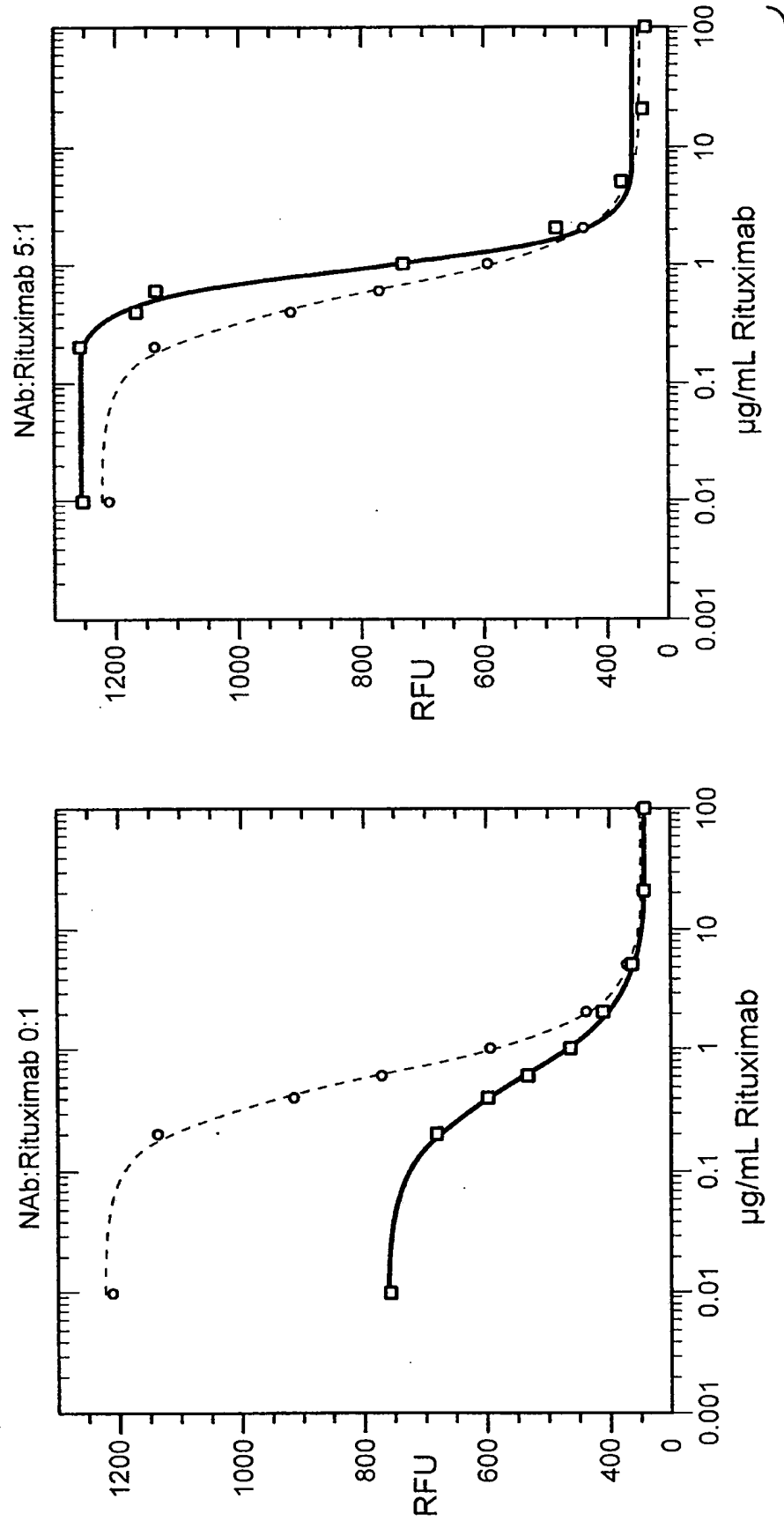


Fig. 13

RESUMO**“MÉTODO DE TRATAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA E KIT DE
DIAGNÓSTICO”**

5 A presente invenção refere-se a método de tratamento prévio de amostra biológica de paciente com doença autoimune, a fim de evitar interferência, especialmente quando a amostra necessitar ser submetida a teste de atividade biológica com base em células, tal como teste de anticorpos neutralizantes.