



INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1009241-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1009241-2

(22) Data do Depósito: 05/03/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 11/10/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 39/395; C07K 16/34; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: FR 0951412 de 06/03/2009.

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-RHD, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(73) Titular: LABORATOIRE FRANÇAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES, Pessoa Jurídica. Endereço: 3 AVENUE DES TROPIQUES, ZA DE COURTABOEUF, LES ULIS, FRANÇA(FR), F-91940

(72) Inventor: CHRISTOPHE DE ROMEUF; CHRISTINE GAUCHER; SYLVIE JORIEUX.

(87) Publicação PCT: WO 2010/100383 de 10/09/2010

Código de Controle: 15013C0751E38B09 A390753B98427B40

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 05/03/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 05/11/2019

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-RhD, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UM
ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**

[001] A invenção se refere a um anticorpo direcionado contra o antígeno Rhesus D (anticorpo anti-RhD).

Fundamentos da invenção

[002] "Rhesus positivo" ou "Rh-positivo" é o termo comumente dado a indivíduos cujas células sanguíneas de série vermelha são aglutinadas por aloanticorpos direcionados contra o antígeno D (um dos antígenos do sistema RH), enquanto "Rhesus negativo" ou "Rh-negativo" se refere a indivíduos cujas células sanguíneas de série vermelha não são aglutinadas por ditos aloanticorpos.

[003] Doença hemolítica do recém-nascido é devido, na maioria dos casos, à presença de aloanticorpos anti-RhD em uma mãe Rh-negativa (aloimunização contra outros antígenos do sistema Rh é muito mais raro) que, em um feto Rh-positivo, causa anemia hemolítica requerendo ou transfusões sanguíneas intrauterinas ou transfusão de troca no nascimento em casos severos.

[004] Aloimunização da mãe geralmente ocorre durante um nascimento anterior quando células sanguíneas de série vermelha do feto entram na circulação materna, induzindo imunização se o feto é Rh-positivo.

[005] Prevenção de doença hemolítica do recém-nascido consiste na administração em uma mãe Rh-negativa de uma injeção de anticorpos anti-RhD imediatamente após o parto ou aborto espontâneo ou provocado.

[006] Os anticorpos anti-Rhesus geralmente utilizados para esse propósito são imunoglobulinas policlonais derivadas de doadores voluntários Rhesus-negativo imunizados várias vezes contra células sanguíneas de série vermelha Rh-positivas.

[007] Isso se apresenta como problema, primeiro em relação à necessidade de um número suficiente de doadores para suprir a demanda, e segundo devido aos riscos de contaminação por vírus e outros patógenos que podem estar presentes nas preparações de imunoglobulina obtidas a partir do sangue de doadores voluntários.

[008] Enquanto vários anticorpos anti-RhD monoclonais foram produzidos para substituir os anticorpos policlonais, nenhum já está disponível para uso clínico (Sibéril et al., Clinical Immunology, 2006, 118:170-179).

[009] O clone T125 produzido por células de mieloma de rato YB2/0 (conhecido como o clone T125 YB2/0), descrito por Sibéril et al., *supra* (e pedido de patente WO2001/77181) foi um candidato promissor, porém pode ser relativamente instável devido a rearranjos intramoleculares.

Sumário da invenção

[0010] Os inventores desenvolveram agora um anticorpo monoclonal anti-RhD inédito que apresenta estabilidade melhorada.

[0011] Dito anticorpo, que é uma imunoglobulina IgG1, contém uma cadeia pesada codificada pela sequência nucleotídica SEQ ID No. 1. Mais particularmente, o anticorpo é uma imunoglobulina IgG1 tetramérica composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, a cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 2, e a cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 4.

[0012] Nessa descrição dito anticorpo pode ser designado como anticorpo R593.

[0013] O anticorpo R593 foi obtido através de mutação do anticorpo R297, derivado do clone T125 A2 clone produzido por linfócitos B transformados por EBV. Como o anticorpo R297, o

anticorpo R593 é um IgG1 tetramérico composto de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves que contêm 32 resíduos de cisteína formando 16 pontes dissulfídicas, dentro da cadeia pesada (4 por cadeia), dentro da cadeia leve (2 por cadeia) e entre as cadeias (4 por cadeia). O anticorpo R593 da invenção difere do anticorpo R297 por um resíduo de fenilalanina no lugar de um resíduo de cisteína na posição 68 da cadeia pesada.

[0014] A especificidade de antígeno deste é tão boa quanto, e a estabilidade é melhorada, devido ao fato de rearranjos intramoleculares indesejados não serem mais possíveis.

[0015] Outro objeto da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo dito anticorpo, em combinação com excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[0016] Preferencialmente, a composição compreende um tampão citrato.

[0017] Vantajosamente, ela pode compreender um poliol como um excipiente, ex. manitol.

[0018] Mais preferencialmente, ela compreende um surfactante não iônico.

[0019] Uma composição particularmente preferencial compreende o anticorpo associado com um tampão citrato 30 mM, pH 6,5, polisorbato 80, manitol, e NaCl. Por exemplo, a composição compreende um tampão citrato 30 mM, pH 6,5, 400 ppm de polisorbato 80, 17g/L de manitol, e 3,25 g/L de NaCl. Outra composição compreende um tampão citrato 30 mM, pH 6,5, 301 ppm de poloxâmero 188, 17 g/L de manitol e 3,25 g/L de NaCl.

Descrição detalhada da invenção

[0020] *Produção de anticorpo*

[0021] O anticorpo monoclonal da invenção pode ser produzido através de qualquer método conhecido por alguém versado na arte, por exemplo, através de recombinação em uma célula hospedeira, transformada com um ou mais vetores permitindo a expressão e/ou secreção de sequência nucleotídicas codificando a cadeia pesada ou a cadeia leve do anticorpo. O vetor geralmente contém um promotor, sinais início e término de tradução, e regiões regulatórias transcrpcionais apropriadas. Ele é estavelmente mantido na célula hospedeira e pode opcionalmente possuir sinais específicos para secreção da proteína traduzida. Esses diferentes componentes são selecionados e otimizados por alguém versado na arte de acordo com a célula hospedeira utilizada.

[0022] Um objeto particular da invenção é, portanto, um ácido nucléico codificando a cadeia pesada de um anticorpo, dita cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 2.

[0023] Outro objeto da invenção é um vetor de expressão, por exemplo, um vetor viral ou plasmidial, compreendendo um ácido nucléico tal como definido aqui. O vetor pode replicar de maneira autônoma na célula hospedeira escolhida, ou ele pode ser um vetor integrativo para a célula hospedeira em questão. Também útil é um vetor de expressão compreendendo um ácido nucléico codificando a cadeia leve do anticorpo. Outro objeto da invenção é um vetor de expressão compreendendo um ácido nucléico codificando a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo, tal como definido aqui.

[0024] Tais vetores são preparados através de métodos familiares a alguém versado na arte, e os clones resultantes podem ser introduzidos em uma célula hospedeira apropriada através de métodos padrão, tais como lipofecção, eletroporação, uso de agentes polycatiônicos, choque térmico, ou métodos químicos.

[0025] Outro objeto da invenção é uma célula hospedeira transfectada com dito vetor ou vetores. A célula hospedeira pode ser selecionada dentre sistemas procarióticos ou eucarióticos, por exemplo, células bacterianas, porém também, células de levedura ou células animais, em particular células de mamífero. Células de inseto ou células de plantas podem também ser utilizadas.

[0026] Em outro aspecto, a invenção apresenta como objeto um método para produção de um anticorpo da invenção, dito método contendo as seguintes etapas: a) cultivar em meio de cultura e condições apropriados uma célula hospedeira expressando uma cadeia pesada e uma cadeia leve tal como definido aqui; e b) recuperar os ditos anticorpos então produzidos a partir de meio de cultura ou a partir de ditas células cultivadas.

[0027] Um exemplo particular de um método de produção é produzir em uma célula de inseto, como descrito, por exemplo, no pedido de patente internacional WO 96/07740. Para esse fim, um cassete de expressão é utilizado compreendendo uma sequência codificando a região variável da cadeia leve do anticorpo monoclonal, ou uma sequência codificando a região variável da cadeia pesada do anticorpo monoclonal, dita sequência é colocada sob o controle transcricional de um promotor apropriado, por exemplo, um promotor de baculovírus.

[0028] Exemplos de promotores de baculovírus incluem os promotores de polihedrina e P10 dos baculovírus AcMNPV ou SIMNPV, ou derivativos de promotores de baculovírus, compostos de promotores sintéticos ou recombinantes, obtidos a partir de um promotor de baculovírus, e funcionais em células de inseto.

[0029] A presente invenção também provê vetores recombinantes, compreendendo pelo menos um cassete de expressão tal como definido aqui acima; nesse contexto, a presente invenção engloba em particular baculovírus recombinantes permitindo a expressão do anticorpo R593, assim

como plasmídeos de transferência permitindo a construção dos ditos baculovírus recombinantes.

[0030] Para permitir a expressão simultânea da cadeia pesada (cadeia H) e da cadeia leve (cadeia L) e sua reassociação para formar a molécula de anticorpo recombinante, alguém pode utilizar dois cassetes em um mesmo vetor de expressão. Desse modo, por exemplo, um baculovírus duplamente recombinante pode ser preparado no qual a sequência codificando cada uma das cadeias H e L está sob o controle de um promotor forte. Para esse fim, alguém pode seguir as etapas abaixo:

[0031] Dois plasmídeos de transferência são preparados separadamente, um para a cadeia H, e um para a cadeia L;

[0032] Células de inseto são então co-transfectadas com o DNA dos vetores de transferência então construídos e o DNA de um baculovírus. Essa co-transfecção acontece em duas etapas: o plasmídeo de transferência contendo o cassete de expressão para o gene de cadeia leve flanqueado pelas regiões ao redor do gene da polihedrina de baculovírus selvagem é utilizado, com o DNA de baculovírus AcMNPV selvagem, para co-transfectar as células de inseto em cultura. Através de recombinação homóloga entre o DNA viral e plasmidial, as sequências codificando a cadeia leve da imunoglobina recombinante são transferidas para o genoma viral.

[0033] Após replicação do DNA viral nas células transfectadas, alguém depois conduz seleção dos baculovírus recombinantes que integraram a sequência da cadeia leve da imunoglobulina recombinante.

[0034] Em uma etapa subsequente, as células são co-transfectadas com o DNA do baculovírus recombinante obtido acima, e com aquele do plasmídeo de transferência contendo o cassete de expressão carregando o gene codificando a cadeia pesada do anticorpo recombinante flanqueado pelas regiões em torno do gene P10 de baculovírus. Através de recombinação

homóloga, como antes, o gene da cadeia pesada é transferido para o DNA viral.

[0035] Vírus duplamente recombinantes capazes de produzir simultaneamente uma cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina são então selecionados.

[0036] Outro exemplo de um método de produção é a utilização de um vetor de expressão viral ou plasmidial para expressar o anticorpo monoclonal em uma célula de mamífero.

[0037] Células de mamíferos preferenciais para expressão de anticorpo monoclonal são a linhagem YB2/0 de rato, a linhagem CHO de hamster, em particular as linhagens CHO dhfr- e CHO Lec13, PER.C6TM (Crucell), 293, K562, NS0, SP2/0, BHK ou COS.

[0038] Um método de produção adicional é a expressão do anticorpo recombinante em organismos transgênicos, por exemplo, em plantas (Ayala M, Gavilondo J, Rodríguez M, Fuentes A, Enríquez G, Pérez L, Cremata J, Pujol M. Production of plantibodies in Nicotiana plants. Methods Mol. Biol. 2009; 483:103-34) ou então no leite de animais transgênicos tais como coelho, cabra ou porco (Pollock, D.P., J.P. Kutzko, E. Birck-Wilson, J.L. Williams, Y. Echelard e H.M. Meade. (1999) Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. Journal of Immunological Methods. 231:147-157).

[0039] *Aplicações terapêuticas*

[0040] O anticorpo anti-RhD da invenção pode ser utilizado como medicamento, em particular para a prevenção de aloimunização Rhesus de indivíduos Rh-negativos. O modo de ação das imunoglobinas anti-D *in vivo* é ligação específica dos anticorpos ao antígeno D das células sanguíneas de série vermelha Rh(D)-positivas, seguido por eliminação dessas células sanguíneas de série vermelha da circulação essencialmente no baço. Essa remoção é associada com um

mecanismo dinâmico de supressão da resposta imune primária no indivíduo, e portanto previne a imunização.

[0041] Logo, o anticorpo da invenção é particularmente útil na prevenção de doença hemolítica do recém-nascido, através de administração em uma mulher Rh-D negativa.

[0042] De fato, um anticorpo da invenção pode ser utilizado de maneira profilática na prevenção de aloimunização de mulher Rhesus-negativa imediatamente após o nascimento de uma criança Rhesus-positiva, e na prevenção, no momento de gravidezes subsequentes, de doença hemolítica do recém-nascido (HDN); no momento de abortos ou gravidezes extrauterinas em uma situação de incompatibilidade de Rhesus D, ou ainda no momento de hemorragias transplacentárias resultantes de amniocenteses, de biópsias coriônicas ou de manipulações obstétricas traumáticas em uma situação de incompatibilidade de Rhesus D.

[0043] Em adição, um anticorpo da invenção pode ser utilizado no caso de transfusões com sangue ou derivados de sangue lábeis.

[0044] Um anticorpo da invenção é também útil na prevenção ou tratamento de púrpura trombocitopênica idiopática (ITP).

[0045] *Formulações*

[0046] Outro objeto da invenção, portanto, se refere a uma composição farmacêutica compreendendo dito anticorpo como um ingrediente ativo, em combinação com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[0047] Na presente descrição, excipiente farmacêuticamente aceitável deve ser entendido como significando um composto ou uma combinação de compostos em uma composição farmacêutica que não causa efeitos colaterais e que, por exemplo, facilita a administração do(s) ingrediente(s) ativo(s), aumentando a meia-vida e/ou eficácia deste(s) no corpo, aumentando a

solubilidade deste(s) na solução ou ainda aumentando o tempo de estocagem deste(s).

[0048] Esses excipientes farmacologicamente aceitáveis são bem conhecidos e irão ser adaptados por alguém com habilidade na arte de acordo com a natureza e método de administração do(s) composto(s) ativo(s) escolhido(s).

[0049] Preferencialmente, a formulação é armazenada em forma líquida, ou em forma liofilizada.

[0050] Compostos de tamponamento podem ser utilizados, por exemplo, na forma de carbonato, fosfato, citrato, acetato, borato, trimetamina [(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol), TRIS], glicina e lisina (PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Vol. 51(4), 1997: Excipients and their use in injectable products (SANDEEP NEMA, R.J. WASHKUHN, R.J. BRENDEN, pp166-171).

[0051] Composições de anticorpo em tampão citrato (por exemplo, em aproximadamente 30 mM) foram mostradas a serem particularmente estáveis. Formulações apresentando um pH de aproximadamente 5,5 a menor que 7, preferencialmente de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,5 são preferenciais.

[0052] Os inventores mostraram que a adição de manitol e NaCl aumenta a solubilidade do anticorpo. A quantidade de manitol e NaCl é geralmente escolhida de modo a obter uma osmolaridade de aproximadamente 300 mOsm/kg.

[0053] A adição de um surfactante do tipo polímero não iônico, tal como polisorbato 80 (Tween® 80) ou um poloxâmero do tipo poloxâmero 188 (Pluronic F68® ou Lutrol F68®) é também vantajoso, por exemplo, em uma quantidade de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 ppm, preferencialmente de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 ppm, preferencialmente de 300 a aproximadamente 400 ppm.

[0054] Mais particularmente, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo da invenção, na presença de tampão citrato 30 mM, pH 6,5, manitol, NaCl, e polisorbato 80 ou um poloxâmero, tal como poloxâmero 188.

[0055] Uma composição farmacêutica preferencial compreende o anticorpo da invenção, na presença de tampão citrato 30 mM, pH 6,5, 400 ppm de polisorbato 80 ou 301ppm de poloxâmero 188, apresentando uma concentração de manitol e NaCl suficiente para alcançar uma osmolaridade de 300mOsm/kg.

[0056] Em uma maneira preferencial, a composição farmacêutica compreende aproximadamente de 0,2 a aproximadamente 5 g/L de anticorpo, preferencialmente aproximadamente 0,3 g/L de anticorpo.

[0057] Preferencialmente, o anticorpo é administrado através da rota sistêmica, em particular através da rota intravenosa, rota intramuscular, rota intradermal, intraperitoneal ou subcutânea, ou através da rota oral. Mais preferencialmente, a composição contendo os anticorpos da invenção é dada em várias administrações, espaçadas ao longo do tempo.

[0058] Os métodos de administração, dosagens e formas farmacêuticas ideais destas podem ser determinados com base no critério geralmente levado em consideração no momento do estabelecimento de um tratamento prescrito a um paciente, tal como a idade ou peso corporal do paciente, a severidade do seu estado geral, a tolerância do tratamento e os efeitos colaterais observados.

[0059] Os seguintes exemplos e desenhos são dados para propósito de ilustração e não como meio de limitação.

Legendas das figuras

[0060] Figura 1: Mapa de restrição do vetor T125-H26.

[0061] Figura 2: Mapa de restrição do vetor T125-DHFR.

- [0062] Figura 3: Mapa de restrição do vetor H416-24.
[0063] Figura 4: Mapa de restrição do vetor T125-Phe68.
[0064] Figura 5: Mapa de restrição do vetor H416-30.
[0065] Figura 6: Mapa de restrição do vetor K416-23.
[0066] Figura 7: Mapa de restrição do vetor HK463-18.
[0067] Figura 8: Desenho esquemático de construção de vetor T125-Phe68.

Exemplos

Exemplo 1: Identificação de instabilidade de anticorpo R297

[0068] Anticorpo R297 é um tetrâmero IgG1 composto de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves que contêm 32 resíduos de cisteína formando 16 fontes dissulfídicas, dentro da cadeia pesada (4 por cadeia), dentro da cadeia leve (2 por cadeia) e entre cadeias (4 por cadeia). O N-terminal da cadeia pesada do anticorpo R297 também carrega uma cisteína não pareada na posição Cys68. A presença desse grupamento SH livre altamente reativo em proximidade com a ponte dissulfídica intra-cadeia Cys22-Cys96 pode causar competição e rearranjos moleculares levando à formação de novas pontes dissulfídicas.

[0069] Os inventores identificaram agora as pontes dissulfídicas de R297 e os possíveis rearranjos moleculares.

[0070] Esse estudo foi conduzido através de mapeamento de peptídeo em condições não redundantes, de modo a preservar a integridade deste, e identificação dos peptídeos resultantes através de espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight).

[0071] Os resultados levaram à identificação das seguintes pontes dissulfídicas: Cys23-Cys88, Cys134-Cys194 para a cadeia leve; Cys22-Cys96, Cys153-Cys209 Cys270-Cys330 e Cys376-Cys434 para a cadeia pesada.

[0072] O espectro de massa MALDI revelou um peptídeo de massa de 1771,79 Da correspondendo ao dipeptídeo [20LSCTASGFTFK30]-[68CTFSR72] (SEQ ID No. 5) contendo a ponte dissulfídica Cys22-Cys68 (massa teórica 1771,81 Da). Análise MS-MS do íon molecular em 1771,797 Da confirmou as sequências LSCTASGFTFK (SEQ ID No. 6) e CTFSR (SEQ ID No. 7) desse dipeptídeo. Por fim, após redução *in situ*, esse pico diminuiu a favor de dois íons em 613.28 e 1161.56 Da correspondendo às massas teóricas de peptídeos [68CTFSR72] (SEQ ID No. 7) e [20LSCTASGFTFK30] (SEQ ID No. 6), respectivamente (massas teóricas: 613,28 e 1161,57 Da). O peptídeo contendo a Cys96 não pareada foi também identificado. Em conjunto, esses resultados demonstram a presença de uma ponte dissulfídica Cys22-Cys68.

[0073] De mesmo modo, o espectro MALDI revelou a presença de um peptídeo de massa 3658,54 Da correspondendo ao dipeptídeo [73DNSQDTLYLQLNSLRPEDTAVYYCAR99]-[68CTFSR72] (SEQ ID No. 8) contendo a ponte dissulfídica Cys22-Cys96 (massa teórica: 3658,58 Da). Análise MS-MS do íon molecular confirmou a sequência do dipeptídeo. Esse pico diminuiu após a redução do alvo a favor de dois íons de massa correspondendo aos peptídeos [68CTFSR72] (SEQ ID No. 7) e [73DNSQDTLYLQLNSLRPEDTAVYYCAR99] (SEQ ID No. 9). O peptídeo contendo a Cys22 livre foi também identificado. Em conjunto, esses resultados demonstram a presença de uma ponte dissulfídica Cys68-Cys96.

[0074] Análise estrutural MALDI-MS identificou todas as pontes dissulfídicas intra-cadeia de R297. Foi notado que a Cys68 não pareada interage com a ponte dissulfídica vizinha Cys22-Cys96 para formar as pontes Cys22-Cys68 e Cys68-Cys96. Esses rearranjos intramoleculares podem induzir mudanças na estrutura tridimensional da região N-terminal de Fab e afetar afinidade para o antígeno e imunogenicidade da proteína. A presença dessas formas diferentes poderia, portanto, requerer suas quantificações, com controle sistemático de

reprodutibilidade e estabilidade dessas formas no produto final durante desenvolvimento.

Exemplo 2: Produção de um anticorpo mutante

[0075] Materiais e métodos

[0076] Métodos convencionais de biologia molecular foram utilizados. Mutagênese foi conduzida através de PCR e a região contendo a mutação foi então amplificada por PCR e clonada em um vetor intermediário. O vetor final foi construído através de clonagem do vetor de cadeia pesada no vetor de cadeia leve. Os vetores recombinantes então obtidos foram, portanto, introduzidos em bactéria (transformação de bactéria) e varridos para sequências de acordo com a sequência esperada, seguido por amplificação (cultura bacteriana) do clone selecionado de modo a obter vetor suficiente para transfecção. Os vetores produzidos durante a cultura bacteriana foram então purificados e linearizados para transfecção da linhagem YB2/0.

[0077] Os seguintes oligos foram utilizados:

Oligo A2VH11

5'CTATATCATATGATGGAAGGAATATACAATATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCACCTTCTC3' (SEQ ID No. 10)

nucleotídeos sublinhados: sítio de restrição NdeI

nucleotídeo em caixa: base mutada, mutação do códon TGC (codificando para o aminoácido Cisteína) para um códon TTC (codificando para o aminoácido Fenilalanina)

[0078] Esse oligo 5' localizado na região VH de T125 A2 introduz uma mutação G→T.

Oligo GSP2ANP

5'GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG3' (SEQ ID N°11)

[0079] Esse oligo 3' (antissenso) está localizado na parte 5' da região constante G1 de T125 A2.

[0080] Os seguintes vetores foram utilizados:

- Vetor T125-H26

[0081] Esse vetor contém a unidade transcricional H do clone T125 A2 (veja mapa de vetor, Figura 1).

- Vetor T125-DHFR

[0082] Esse vetor contém as unidades transcricionais H e Kappa do clone T125 A2 assim como DHFR TU (veja mapa de vetor, Figura 2).

- Vetor H416-24

[0083] Esse vetor intermediário de cadeia pesada contém a unidade transcricional H do clone T125 A2 (veja mapa de vetor, Figura 3).

- H416-30

[0084] Esse vetor de expressão de cadeia pesada contém a mutação C68F na região variável do anticorpo VH. Ele foi obtido a partir de plasmídeo T125-Phe68 (mapa, Figura 4) contendo a mutação C68F e um vetor sem íntron intermediário (mapa, Figura 5).

- Vetor K416-23

[0085] Esse vetor de expressão de cadeia leve contém a unidade de transcrição do clone T125 A2 e a unidade de transcrição DHFR (veja mapa, Figura 6).

[0086] Resultados:

[0087] Sequenciamento do anticorpo anti-D R297 derivado a partir do clone T125 A2 (linfócitos B transformados com EBV provenientes de um doador imunizado) mostrou que a região variável da cadeia pesada (VH) contém uma cisteína na posição 68 {posição 67 de acordo com a nomenclatura de Kabat [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", NIH Publication, 91-3242 (1991)] localizada na região 3 da fase de leitura (FWR3, de Kabat)}. Dito anticorpo, portanto, contém outro resíduo de cisteína em adição às duas cisteínas nas posições 22 e 96 (posições 22 e 92 na nomenclatura de Kabat) envolvida em uma ponte dissulfídica.

[0088] Mutagênese foi conduzida através de amplificação por PCR de um fragmento a partir da região 3' da sequência VH no vetor de cadeia pesada T125-H26 com o auxílio dos oligos descritos anteriormente. O códon TGC codificando o aminoácido cisteína foi substituído por um códon TTC codificando o aminoácido fenilalanina.

[0089] Esse fragmento 3' de VH então obtido foi ligado com o fragmento 5' de VH em um vetor intermediário disponível comercialmente (contendo o fragmento VH 5' proveniente de T125-H26). O fragmento resultante Phe68 VH, correspondendo ao fragmento VH mutado, foi então inserido no vetor T125 DHFR para criar o vetor de expressão final T125-Phe68 (diagramaticamente representado na Figura 8).

[0090] O vetor T125-Phe68, portanto, contém a unidade de transcrição (TU) kappa de T125 A2 e a unidade de transcrição H (F68) mutada. A presença da mutação foi verificada através de sequenciamento de quatro clones.

[0091] O vetor de expressão final HK463-18 (veja mapa, Figura 7) contendo as unidades de transcrição (TU) mutada H (F68) e kappa do anticorpo anti-D T125 A2 foi construído através de clonagem do vetor de cadeia leve K416-23 (contendo a TU para kappa e DHFR) em um vetor de cadeia pesada otimizado H416-30 (codificando a cadeia pesada contendo a mutação C68F na região VH). Esses dois vetores de expressão foram previamente utilizados para co-transfecções da linhagem YB2/0.

Exemplo 3: Caracterização funcional do anticorpo mutante

[0092] Esse estudo avalia o efeito da mutação C68F na atividade funcional do anticorpo anti-D T125.

[0093] Sangue foi coletado a partir de doadores voluntários em tubos com 7 mL de citrato fornecidos pelo Etablissement Français du Sang (EFS) em Rungis.

[0094] - Células de sangue de série vermelha Rhesus D negativas (grupos ABO indiferentemente)

[0095] - Células de sangue de série vermelha Rhesus D positivas grupo O R1R1 (densidade antigênica ótima).

[0096] 3.1. Estudo de funções especificamente ligadas ao fragmento Fab

[0097] Estudo de especificidade de reconhecimento de epítopo D

[0098] Nas condições de ensaio utilizadas, nenhuma ligação do anticorpo anti-D não mutante (C68) ou mutante (F68) foi observada em células de sangue de série vermelha a partir de doadores Rhesus negativos em comparação com um controle autofluorescente não específico. Isso confirma a especificidade de reconhecimento do epítopo D desses dois anticorpos.

[0099] Determinação citométrica de atividade específica anti-D

[00100] As atividades específicas de anticorpos não mutante (C68) e mutante (F68) foram idênticas (15% de intervalo de confiança). A funcionalidade do fragmento Fab é similar para os dois anticorpos testados.

[00101] Estudo citométrico de competição *in vitro* entre células de sangue de série vermelha O+ R1R1 saturadas ou não com o anticorpo anti-D

[00102] Nas condições experimentais de competição, as constantes de dissociação para os três anticorpos testados foram equivalentes. Logo, pode ser concluído que a mutação C68F não apresenta efeito na constante de dissociação.

[00103] Conclusão

[00104] De acordo com esses dados, especificidade antigênica e atividade anti-D específica são idênticas para os anticorpos anti-D não mutante (C68) e mutante (F68). Portanto, a funcionalidade do fragmento Fab (sítio de reconhecimento antígeno-anticorpo) não parece ser modificada pela mutação C68F.

[00105] 3.2. Testes funcionais *in vitro* dos fragmentos Fc e Fab do anticorpo anti-D

[00106] Os anticorpos anti-D não mutante (C68) e mutante (F68) foram avaliados em dois testes medindo ligação de anticorpo ao antígeno e participação do fragmento Fc deles com CD16 (receptor FcγRIII).

[00107] Atividade ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo)

[00108] Não houve grandes diferenças na atividade ADCC entre os anticorpos não mutante (C68) e mutante (F68); a porcentagem de lise observada com todos esses anticorpos estava entre a do anticorpo R297 e a do anticorpo policlonal WinRho. As curvas tiveram que ser modeladas com o auxílio do programa de computador PRISM para uma comparação mais acurada de atividade de anticorpo.

[00109] Valores Emax (concentração de anticorpo na atividade máxima) foram 46 ± 7 ng/mL e 48 ± 2 ng/mL para anticorpos não mutante (C68) e mutante (F68), respectivamente. A EC50 (concentração de anticorpo produzindo 50% de atividade máxima) foi 20 ± 3 ng/mL e 21 ± 2 ng/mL para anticorpos não mutante (C68) e mutante (F68), respectivamente.

[00110] Modelagem de curva e os valores de Emax e EC50 indicam que a mutação C68F não apresenta efeito na atividade ADCC do anticorpo.

[00111] Ativação de CD16

[00112] A porcentagem de ativação de CD16 foi $104 \pm 7\%$ e $100 \pm 16\%$ para anticorpos não mutante (C68) e mutante (F68), respectivamente.

[00113] Conclusão

[00114] Esses dados indicam que a atividade ADCC e a ativação CD16 não foram modificadas pela mutação C68F.

[00115] Os resultados desses diferentes testes mostram que as funções de anticorpo anti-D T125 A2 conduzidas pelo domínio Fab (especificidade, atividade específica, dissociação) e o domínio Fc (ADCC, ativação de CD16) não foram modificadas pela mutação C68F.

Exemplo 4: Estudo estrutural comparativo dos clones mutantes e não mutantes

[00116] Caracterização das glicanas nos anticorpos anti-D não mutante (C68) e mutante (F68) foi conduzida através de HPCE-LIF (high performance capillary electrophoresis - laser induced fluorescence).

[00117] Os mapas de glicanas dos anticorpos anti-D não mutante (C68) e mutante (F68) apresentaram perfis similares apresentando formas bi-antênárias, não sialiladas agalactosiladas fucosiladas ou não fucosiladas (G0F, G0) e formas monogalactosiladas fucosiladas ou não fucosiladas (G1F, G1). As formas predominantes foram sempre do tipo agalactosiladas (G0). Existiram diferenças na porcentagem de formas fucosiladas que foi menor para o anticorpo anti-D mutante (F68). A estrutura mutante também continha um resíduo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) na posição de bifurcação, i.e. entre as duas antenas. Essas estruturas GlcNAc de bifurcação estavam ausentes no anticorpo anti-D não mutante (C68).

[00118] Essas diferenças estruturais no grau de fucosilação e GlcNAc de bifurcação não afetam a atividade ADCC ou ativação CD16. A diferença no perfil de glicosilação provavelmente não está relacionada à mutação. De fato, estudos de anticorpos monoclonais diferentes produzidos na linhagem YB2/0 indica que perfis de glicosilação variam enormemente em diferentes clones, porém também de acordo com os tempos de cultura para um mesmo clone.

[00119] A mutação Cisteína→Fenilalanina na posição 68 (C68F) na região variável da cadeia pesada do clone T125 A2 foi gerada através de PCR. A sequência da região variável da cadeia pesada contendo a mutação pontual G→T foi amplificada a partir do plasmídeo T125-Phe68 e clonado em um vetor de cadeia pesada otimizado H416-30. Depois, um vetor único de expressão HK463-18 foi construído a partir do vetor de cadeia pesada H416-30 e do vetor de cadeia leve K416-23. A presença da mutação foi checada através de sequenciamento de qualidade FDA. O anticorpo mutante F68 derivado a partir desse vetor único pode, portanto, ser produzido na linhagem YB2/0.

[00120] Análise funcional mostrou que a especificidade de reconhecimento de antígeno, a atividade específica anti-D e a constante de dissociação não foram modificadas pela mutação C68F. Além disso, a atividade ADCC e ativação CD16 não foram afetadas.

[00121] Existem algumas diferenças estruturais entre clones não mutante (C68) e mutante (F68). Os clones mutantes (F68) apresentam um menor grau de fucosilação e uma N-acetilglucosamina (GlcNAc) na posição de bifurcação. Essa diferença no perfil de glicosilação não afetou a funcionalidade de anticorpo e é, portanto, provavelmente não relacionada com a mutação C68F.

[00122] Em conclusão, o anticorpo anti-D da invenção contendo a mutação C68F apresenta funcionalidade similar ao do anticorpo R297 do clone T125 A2.

Exemplo 5: Formulações do anticorpo

[00123] As seguintes formulações foram preparadas.

Tabela 1. Formulação de anticorpo com Tween ® 80 :

[00124]	Ingrediente	[00125]	Concentração
[00126]	Anticorpo da invenção	[00127]	0,3 g/L
[00128]	Tampão citrato	[00129]	30 mM
[00130]	Manitol	[00131]	17 g/L
[00132]	NaCl	[00133]	3,25 g/L
[00134]	Polisorbato 80	[00135]	400 ppm

pH=6,5

Tabela 2. Formulação de anticorpo com Lutrol ® F 68 :

[00136]	Ingrediente	[00137]	Concentração
[00138]	Anticorpo da invenção	[00139]	0,3 g/L
[00140]	Tampão citrato	[00141]	30 mM
[00142]	Manitol	[00143]	17 g/L
[00144]	NaCl	[00145]	3,25 g/L
[00146]	Poloxâmero 188 (Lutrol ® F 68)	[00147]	301 ppm

pH=6,5

[00148] As formulações foram submetidas à testagem de estabilidade ao longo de vários meses. Critério de estabilidade incluiu inspeção visual frequente das garrafas

contendo a formulação (para avaliar cor, opacidade e possível presença de matéria particulada), controle de pH, osmolaridade, avaliação de degradação de anticorpo (através de SDS PAGE em condições redutora e não redutoras), controle de possível agregação de anticorpo. Testes de pureza foram também conduzidos através de IEF (isoelectric focusing) e HPSEC (high performance size exclusion chromatography). Status de oxidação foi determinado através de RP-HPLC.

[00149] As formulações foram estáveis por 12 meses a 5°C e por pelo menos 4 meses a 25°C.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal anti-RhD, **caracterizado** por ser uma imunoglobulina IgG1 tetramérica composta de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, a cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 2, e a cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 4.
2. Método para produção de um anticorpo conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do dito método compreender as seguintes etapas: a) cultivar em meio e condições de cultura apropriados uma célula hospedeira expressando uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência SEQ ID No. 2, e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência SEQ ID No. 4; e b) recuperar os ditos anticorpos produzidos a partir do meio de cultura ou a partir das ditas células cultivadas.
3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por ser utilizado como medicamento.
4. Composição farmacêutica **caracterizada** por compreender o anticorpo conforme definido na reivindicação 1, em combinação com excipientes farmacêuticamente aceitáveis.
5. Composição de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** por compreender um tampão citrato.
6. Composição de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizada** por compreender um surfactante não iônico.
7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 4 a 6, **caracterizada** por compreender um tampão citrato 30 mM, pH 6,5, polisorbato 80 ou um poloxâmero, manitol e NaCl.
8. Composição de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** por compreender um tampão citrato 30 mM, pH 6,5, 400 ppm polisorbato 80, 17 g/L de manitol e 3,25 g/L de NaCl.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** por compreender um tampão citrato 30 mM, pH 6,5, 301 ppm de poloxâmero 188, 17 g/L de manitol e 3,25 g/L de NaCl.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 9, **caracterizada** pelo fato da concentração do anticorpo ser 0,3 g/L.

11. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser para uso na prevenção de aloimunização Rhesus de indivíduos Rh-negativos.

12. Anticorpo de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** por ser usado na prevenção de doença hemolítica do recém-nascido, através de administração em uma mulher RhD-negativa.

13. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser usado na prevenção ou tratamento de Púrpura Trombocitopênica Idiopática (ITP).

FIGURA 1

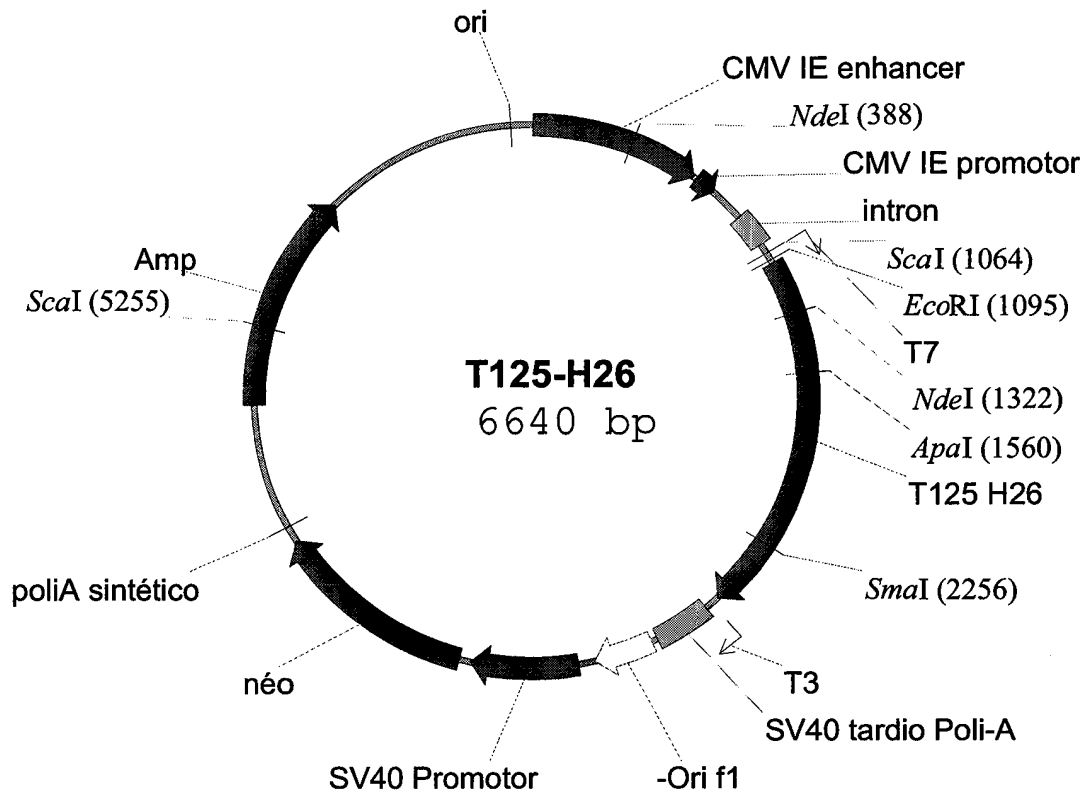


FIGURA 2

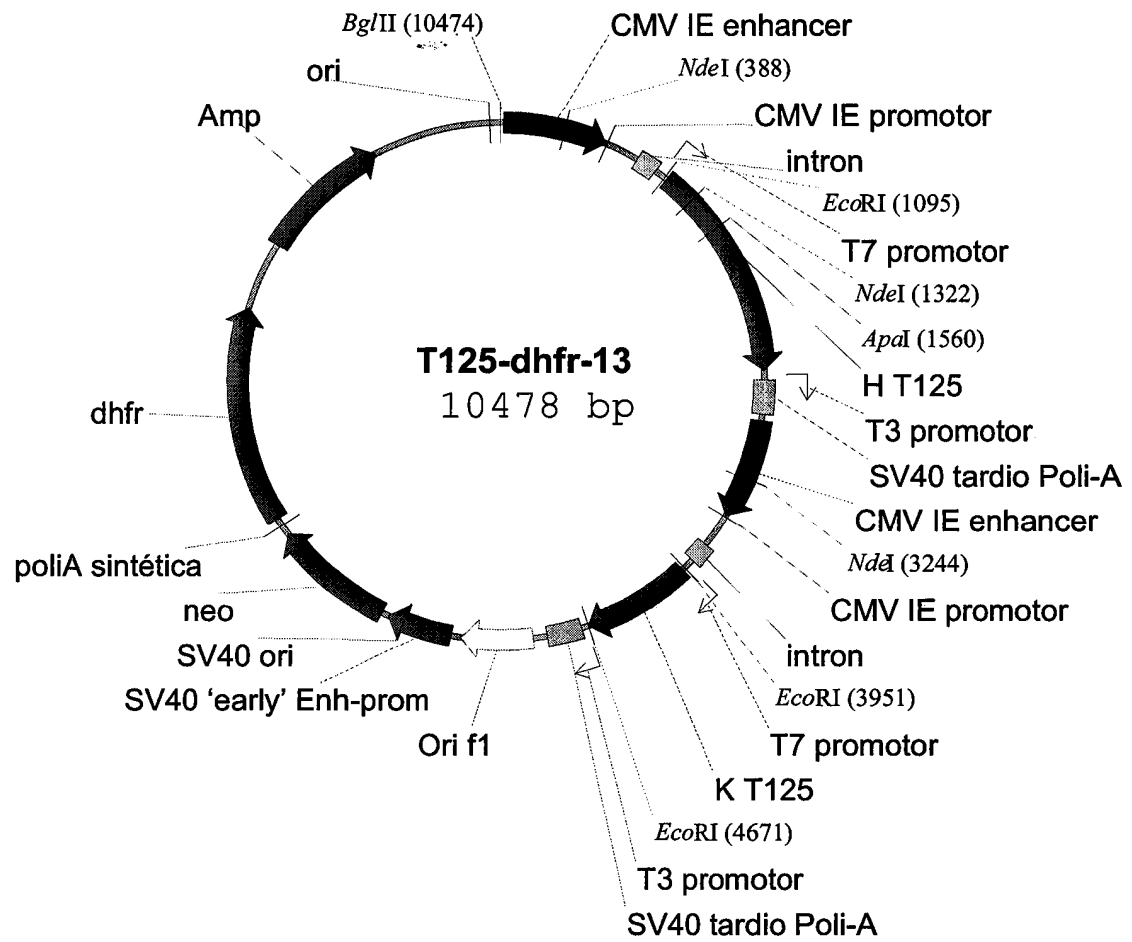


FIGURA 3

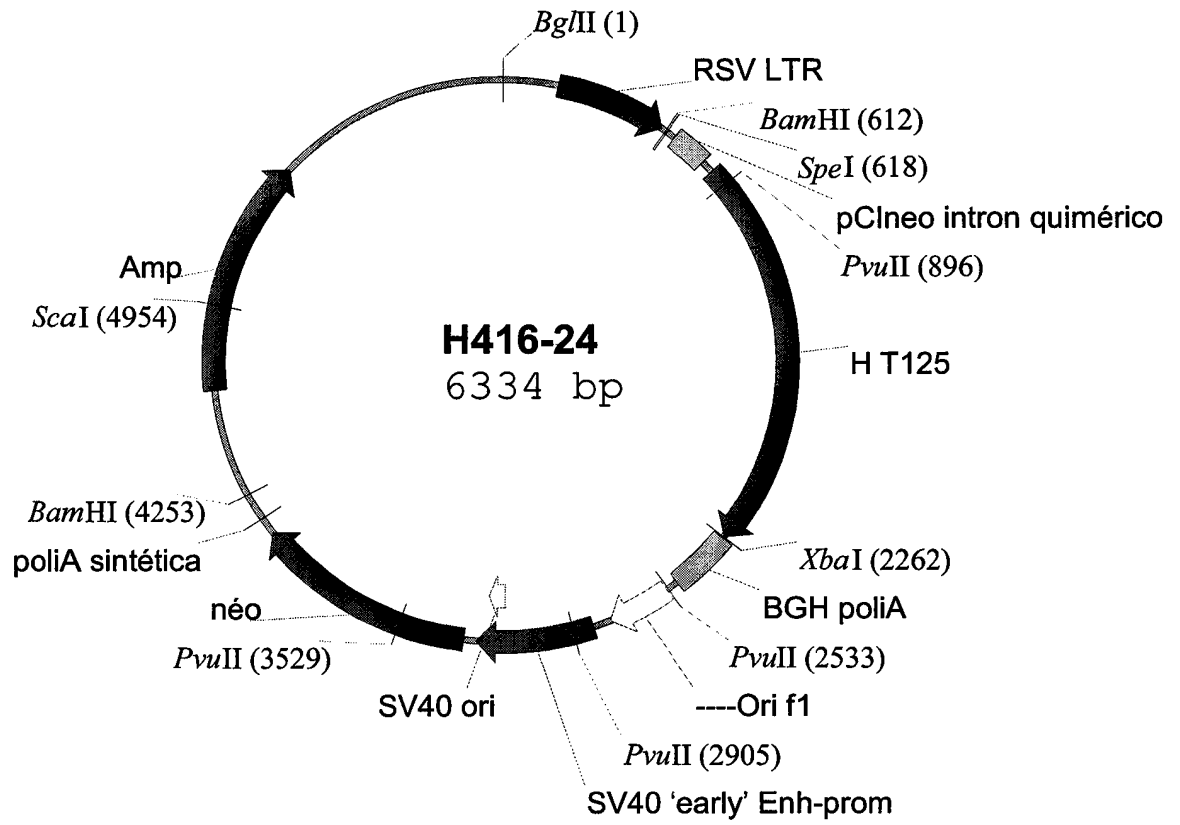


FIGURA 4

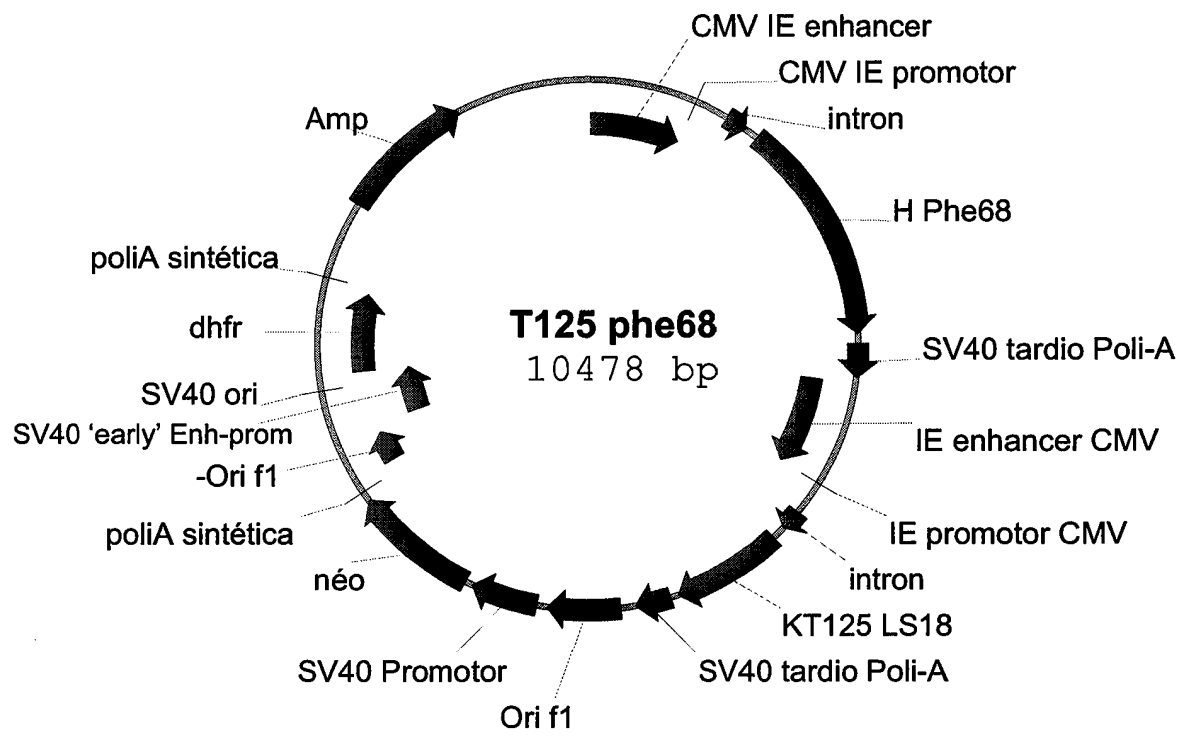


FIGURE 5

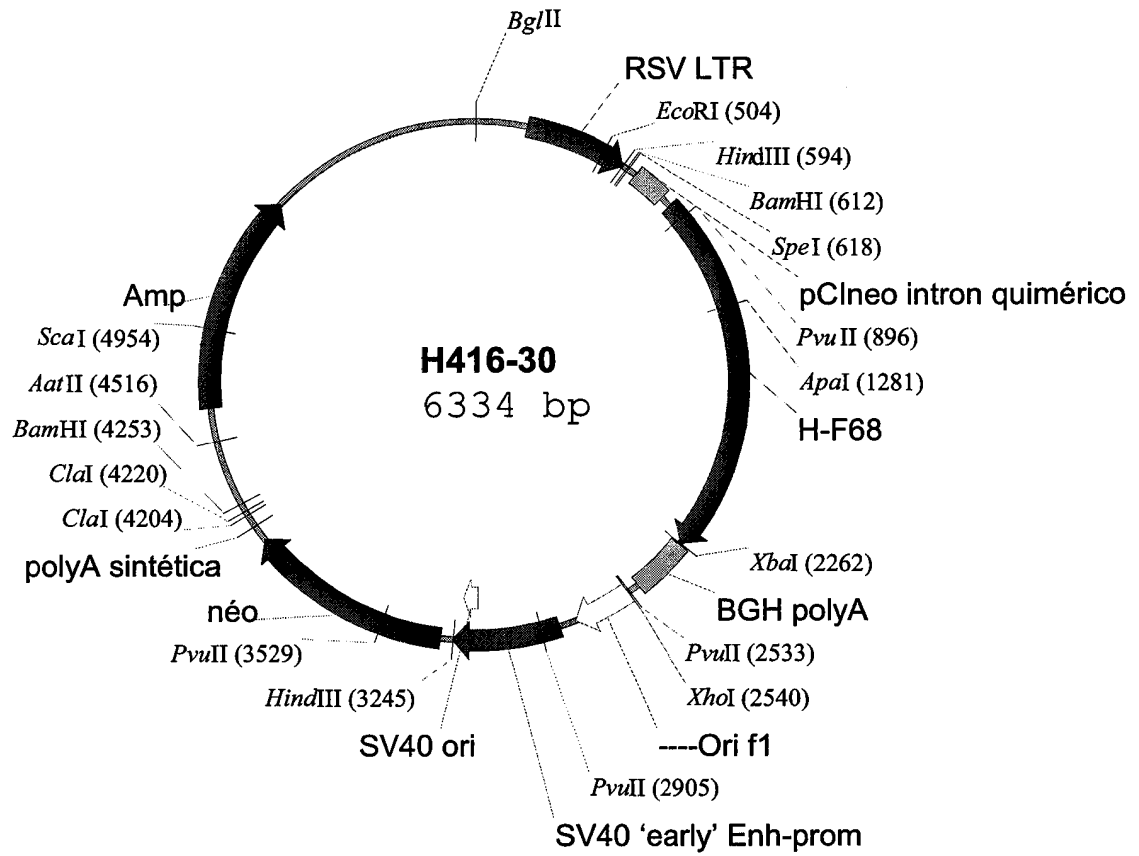


FIGURA 6

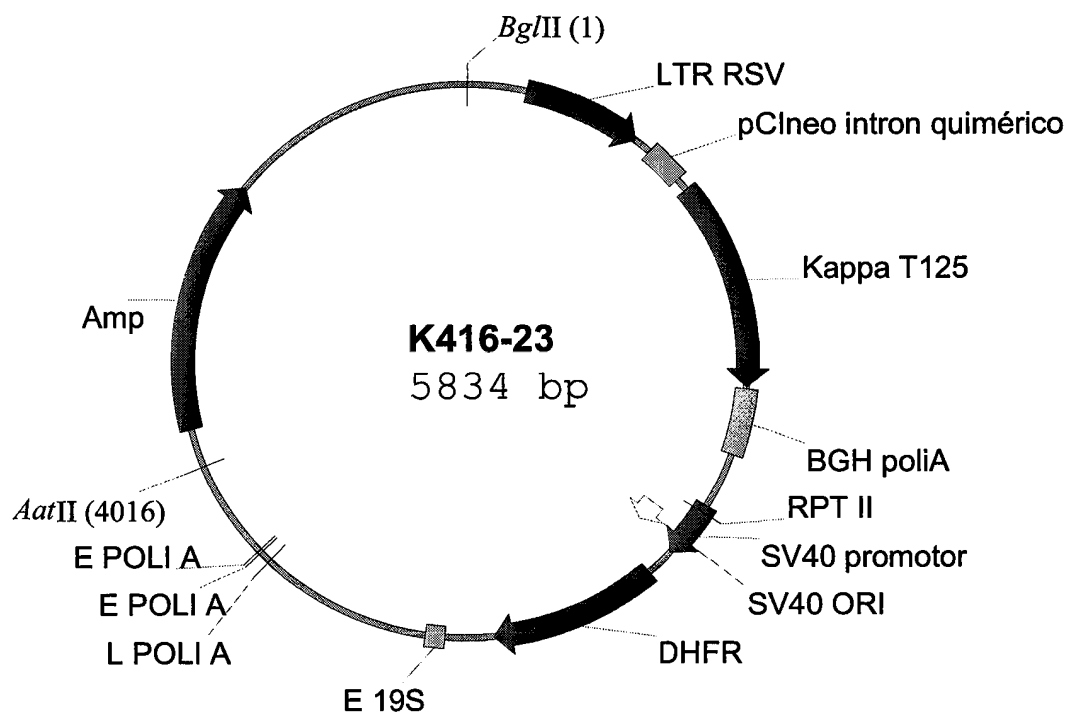


FIGURA 7

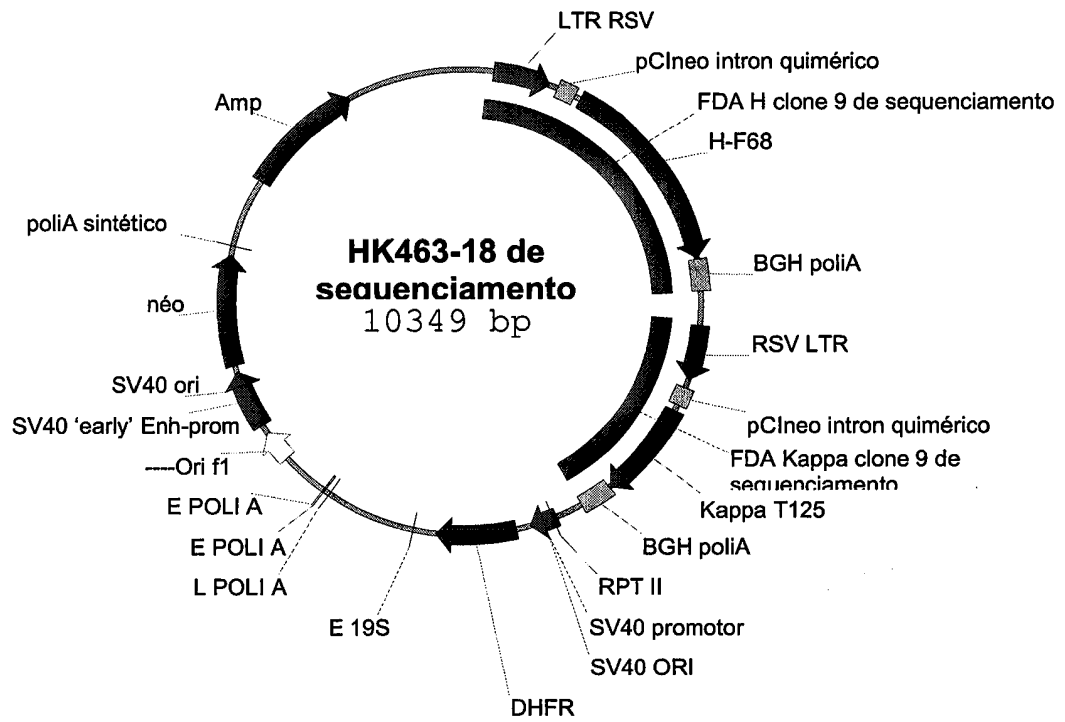


FIGURA 8

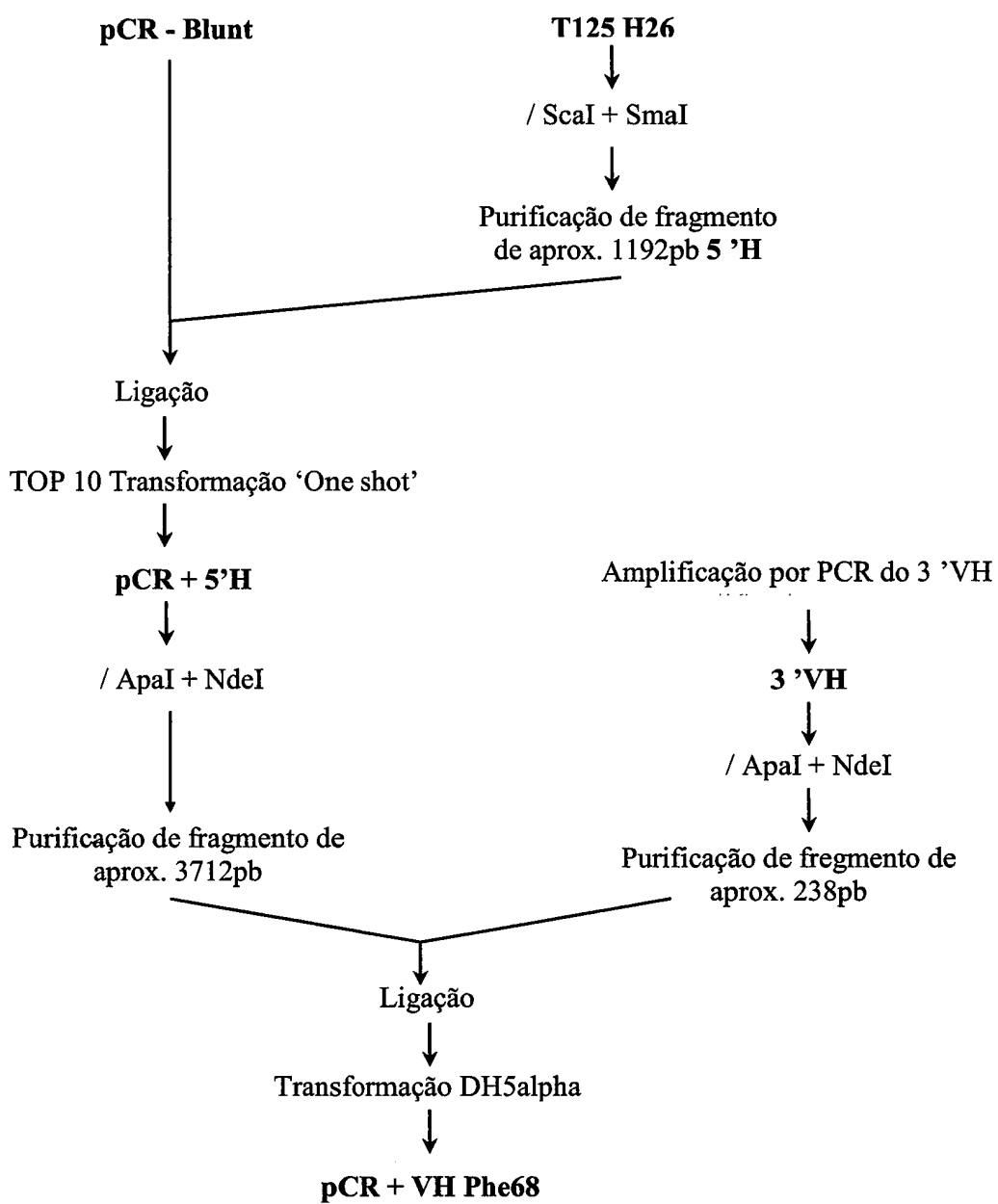


FIGURA 8 (Continuação)

