



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

**(21) PI 0720437-0 A2**



\* B R P I 0 7 2 0 4 3 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 06/12/2007

(43) Data da Publicação: 07/01/2014

(RPI 2244)

(51) *Int.Cl.:*

A61K 39/395

A61P 25/00

A61P 9/00

A61P 1/00

**(54) Título:** ANTICORPOS ANTAFONÍSTICOS  
CONTRA EPHB3

**(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 07/12/2006 US 60/873,386

**(73) Titular(es):** Novartis AG, Xoma Technology LTD.

**(72) Inventor(es):** Linda Masat, Ssucheng Jeff Hsu

**(74) Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler &  
Ipanema Moreira

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2007086649 de  
06/12/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/070780de  
12/06/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPOS ANTAGONÍSTICOS CONTRA EPHB3**".

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se a métodos para prevenir e tratar doenças ou distúrbios relacionados com EphB3 administrando anticorpos antagonistas de EphB3.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

EphB3 é um receptor na família de tirosina cinase receptora de efrina. Atualmente existem 14 receptores de Eph e 9 ligantes de efrina conhecidos em humanos. Os receptores de efrina (Ephs) e seus ligantes, as efrinas, mediam numerosos processos de desenvolvimento, particularmente no sistema nervoso e sistemas vasculares. As efrinas são também conhecidas desempenharem um papel em desenvolvimento de tumor, angiogênese, crescimento metastático e sobrevivência celular. Com base em suas estruturas e ligações de sequência, as efrinas são divididas na classe de efrina-A (EFNA), que é ancorada à membrana por uma ligação de glicosilfosfatilinositol, e a classe de efrina-B (EFNB), que são proteínas de transmembrana. A família Eph de receptores é dividida em 2 grupos com base na similaridade de suas seqüências de domínio extracelular e suas afinidades para ligantes de efrina-A e efrina-B de ligação. Receptores de Eph compõem o maior subgrupo da família tirosina cinase receptora (RTK).

Ephs parecem funcionar por sinalização na ativação. A ligação de efrina induz a oligomerização do receptor de Eph causando a fosforilação de resíduos de justamembrana de Ephs. As Ephs ativadas têm múltiplas tirosinas fosforiladas que agem como sítios de redução para proteínas de sinalização (por exemplo, proteínas contendo RasGAP, Src, LMW-PTP, pLCg, p13-cinase, Grb2, e PDZ).

Superexpressão de receptores de Eph (EphA1, EphA2, EphB2) causa a transformação na ausência de hiperfosforilação de receptor. Receptores de EphB fosforilados regulam negativamente a série de reação de Ras-MAP-cinase e sinalização de FAK, prejudicando o crescimento celular.

EphB3 foi implicada como desempenhando um papel em uma

variedade de estados de doença. Por exemplo, a expressão de EphB3 está associada com a hiperplasia característica e atrofia vilosa observada em doença celíaca (Diasdado e outro, Gut, 53(7): 944-951(2004)). EphB3 também foi também sugerida ser neuroprotetora em acidente vascular cerebral e doença neurodegenerativa. A superregulação de expressão de EphB3 após o dano pode também contribuir para um ambiente na coluna espinhal que seja inibitória para regeneração axonal (Willson e outro, Cell Transplant, 12(3):279-90(2003)). Um ligante de EphB3, Efrina B2, é observado ser superregulado em doença angiogênica ocular (Ozaki e outro, Am. J. Ophthalmol., 138(2):270-9(2004)).

Desse modo, existe uma necessidade de identificar composições e métodos que modulam a EphB3 e seu papel em tais doenças. A presente invenção é direcionada a estas, bem como outras, necessidades importantes.

## 15 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A sequência de nucleotídeo para EphB3 é apresentada na SEQ ID NO: 1, e a sequência de aminoácido é apresentada na SEQ ID NO: 2. O domínio extracelular (ECD) consiste em aminoácidos 1 a 559 da SEQ ID NO: 2. Alternativamente, o ECD consiste em 34 a 555 de SEQ ID NO: 2 (Observe que existem dois números de loco correspondendo à EphB3 humana na base de dados NCBI Entrez de seqüências de proteína. Em ambos os casos, as predições foram feitas pelos pesquisadores submetendo as seqüências como (a) o número de aminoácidos codificados pela região de codificação do códon de partida ATG para o códon de terminação; (b) aquele estiramento de aminoácidos em que a seqüência precursora representa a secreção de seqüência sinal (esta sequência seria presa durante o processo de maturação para criar a proteína madura); e (c) aquele estiramento de resíduos que representa a região de transmembrana. Visto que o domínio "extracelular" de uma proteína madura é qualquer que se situe entre a sequência sinal e o domínio de transmembrana, a extensão predita do ECD depende de onde você coloca as regiões sinais e TM. Ambas as submissões de local (NP\_004434 e P54753) predizem que o precursor é de 998 aminoáci-

dos de comprimento, e que o sinal de secreção abrange os resíduos 1 a 33. Desse modo, ambos concordam que o início do ECD é o resíduo 34. Entretanto, discordam do início da região TM: NP\_004434, predizem que o início é o resíduo 556 (estabelecendo o término do ECD o aminoácido número 555), enquanto que P54753 prediz o início da TM no resíduo 560 (estabelecendo o término do ECD no aminoácido número 559)). Como descrito nos exemplos inclusos, um ECD consistindo nos aminoácidos 37-558 foi usado para imunizações para geração de anticorpo.

Os materiais e métodos da presente invenção atendem às necessidades anteriormente mencionadas e outras relacionadas na técnica. A invenção geralmente refere-se a anticorpos de antagonista de EphB3 que reduz a atividade de receptor de EphB3, métodos de preparação de tais anticorpos, e métodos de uso de anticorpos antagonistas de EphB3 para tratar uma doença ou distúrbio relacionada com EphB3.

Em uma modalidade da invenção, um anticorpo antagonista que se liga ao domínio extracelular de EphB3 com uma afinidade (KD) de  $10^{-6}$  M ou menos e compete com qualquer dos anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019 para ligar-se ao EphB3 por mais do que 75% é fornecido. Pelo termo "afinidade (KD) de  $10^{-6}$  M ou menos" entende-se uma afinidade de, por exemplo,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M ou  $10^{-12}$  M (isto é, um número menor do que  $10^{-6}$  M). Em outra modalidade, o anticorpo antagonista liga-se ao mesmo epítipo de EphB3 como qualquer dos anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019. Em ainda outra modalidade, um anticorpo antagonista é fornecido que compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de qualquer dos anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019. Em ainda outra modalidade, um anticorpo anteriormente mencionado é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo construído humano, um anticorpo humano, um anticorpo de cadeia única ou um fragmento de anticorpo.

Em outra modalidade da invenção, um anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido em que pelo menos um aminoácido

dentro de uma CDR é substituído por um resíduo correspondente de uma CDR correspondente de outro anticorpo anti-EphB3. Em outra modalidade, um anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido em que um ou dois aminoácidos dentro de uma CDR foi modificado. Em ainda outra modalidade, o anticorpo antagonista retem pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% identidade sobre a região leve ou pesada variável para os anticorpos de XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019. Em ainda outra modalidade, o anticorpo antagonista compreende uma região constante de uma sequência de anticorpo humano e uma ou mais regiões de estrutura variável de cadeia pesada e leve de uma sequência de anticorpo humano. Em ainda outra modalidade, o anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido, no qual a sequência de anticorpo humana é uma sequência humana individual, uma sequência de consenso humana, uma sequência de linha germinativa humana individual, ou uma sequência de linha germinativa de consenso humana.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo antagonista anteriormente mencionado em que região constante de cadeia pesada é uma modificada ou não modificada IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, um fragmento das mesmas, ou combinações das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo antagonista tem uma afinidade de ligação de  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  ou  $10^{-11}$  M ou menos a EphB3. Em ainda outra modalidade, um anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido compreendendo uma substituição conservativa nas CDRs. Em ainda outra modalidade, um anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido compreendendo mudanças conservativas ou não-conservativas nos resíduos e risco baixo e moderado. Em outra modalidade, um anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido onde a região constante de cadeia leve é uma região constante de cadeia leve lambda modificada ou não-modificada, uma região constante de cadeia leve kapa, um fragmento das mesmas, ou combinações das mesmas.

Ensaio in vitro para medir a inibição de atividade de EphB3 são

conhecidos na técnica. Por exemplo, ensaios de migração celular (ex. ensaios de migração HUVEC para angiogênese, migração de célula intestinal para doença Celíaca, células inflamatórias em acidente vascular cerebral) e ensaios de adesão de matriz (ex. Laminina, fibronectina) são contemplados

5 (Miao, H. e outro, J. Biol. Chem., 280(2): 923-931 (2005); Wang, Y. e outro, Angiogenesis, 7:335-345 (2004); Nakada, M e outro, Cancer Res., 66(17):8492-8500 (2006); e Gupta, S.K. e outro, J. Leuko. Biol. 66(1):135-143 (1999)).

Em todavia outras modalidades exemplares, um anticorpo antagonista anteriormente mencionado é fornecido que realça a proliferação celular, por exemplo, proliferação celular neural e/ou regeneração. Em outras modalidades exemplares, um anticorpo antagonista que inibem a proliferação celular, por exemplo, associada com células intestinais, por exemplo, em doença celíaca, ou vascular ou células endoteliais, por exemplo, em angiogênese é útil.

10

15

Numerosos métodos são contemplados pela presente invenção. Em uma modalidade da invenção, um método de avaliar quanto a um anticorpo antagonista para o domínio extracelular de uma proteína EphB3 útil para o tratamento de doenças ou distúrbios relacionados com EphB3 é fornecido compreendendo as etapas de: contatar um polipeptídeo compreendendo o ECD de EphB3 com um anticorpo candidato que contém pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019; detectar a afinidade de ligação do anticorpo candidato para o polipeptídeo, e identificar o anticorpo candidato

20

25

30

como um anticorpo antagonista útil para o tratamento de uma doença ou distúrbio relacionado com EphB3 se uma afinidade de ligação de pelo menos  $10^{-6}$  M for detectada. Em ainda outra modalidade, um método de sistematicamente alterar anticorpos e analisar quanto a um anticorpo antagonista para o domínio extracelular de uma proteína EphB3 útil para o tratamento de uma doença ou distúrbio relacionado com EphB3 é fornecido compreendendo as etapas de: preparar um anticorpo candidato que contenha modificações para um ou dois aminoácidos dentro das CDRs de anticorpos

XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019; contar um polipeptídeo compreendendo o ECD de EphB3 com o anticorpo candidato; detectar a afinidade de ligação do anticorpo candidato para o polipeptídeo, e identificar o anticorpo candidato como um anticorpo antagonista útil para o tratamento de doenças ou distúrbios relacionados com EphB3 se uma afinidade de ligação de pelo menos  $10^{-6}$  M for detectada.

Em ainda outra modalidade, um método de avaliar quanto a um anticorpo antagonista para o domínio extracelular de uma proteína EphB3 útil para o tratamento de Doenças ou distúrbios relacionados com EphB3 é fornecido compreendendo as etapas de: contatar uma célula intestinal, endotelial ou neural com um anticorpo candidato que contenha pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019 ou um anticorpo que contenha uma modificação de um ou dois aminoácidos dentro de uma ou mais CDRs; detectar a proliferação ou sobrevivência da célula; e identificar o anticorpo candidato como um anticorpo antagonista útil para o tratamento de doença ou distúrbio relacionado com EphB3 se uma alteração na proliferação ou sobrevivência celular for detectada.

Em ainda outra modalidade, um método de tratar um indivíduo sofrendo de doença celíaca ou outras doenças associada com proliferação celular intestinal patológica é fornecido compreendendo a etapa de administrar um dos anticorpos anteriormente mencionados em uma quantidade terapêuticamente eficaz. Em ainda outras modalidades, um método de tratar neurodegenerative doenças, ou para estimular regeneração neuronal axonal ou outra após danos isquêmicos ou traumáticos ou outros aos nervos ou coluna espinhal, é fornecido. Doenças neuronais exemplares incluem dano aos neurônios por dano traumático, por isquemia vascular local ou cerebral, por toxinas, ou por infecção incluindo infecção viral, bacteriana, fúngica ou parasítica, bem como doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, demência senil, Esclerose Lateral Amiloide (ALS), Esclerose Múltipla (MS), neuropatia periférica, atrofia muscular espinhal, doença de Creutzfeldt-Jakob, ou demência de AIDS. Em outra modalidade, um método

de tratar doenças angiogênicas ou outras doenças associada com proliferação celular vascular patológica é fornecido compreendendo a etapa de administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um dos anticorpos anteriormente mencionados. Doenças angiogênicas exemplares incluem ocular

5 doenças tais como retinopatia diabética ou retinopatia de prematuridade, ou degeneração macular relacionada com a idade, bem como psoríase, artrite reumatóide, ateroma, restenose arterial, hemangioma, doenças autoimunes, angiogênese associada com outra inflamação aguda ou crônica, formação de cicatrização ou adesão, ou endometriose. Em ainda outra modalidade,

10 um segundo agente terapêutico é administrado. Em ainda outra modalidade, o paciente é também tratado com outros agentes terapêuticos ou cirurgia.

Em ainda outra modalidade da invenção, um método de alvejar uma célula expressando EphB3 é fornecido compreendendo a etapa de administrar um anticorpo antagonista anteriormente mencionado, conjugado a

15 um radionuclídeo ou outra toxina. Em ainda outra modalidade, um método anteriormente mencionado é fornecido no qual o paciente é um mamífero. Em ainda outra modalidade, o paciente é um humano.

Em outra modalidade da invenção, uma molécula de ácido nucléico isolada é fornecida compreendendo uma sequência de nucleotídeo

20 que codifica a cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo antagonista anteriormente mencionado. Em ainda outra modalidade, um vetor de expressão é fornecido compreendendo a molécula de ácido nucléico anteriormente mencionada operavelmente ligada a uma sequência de controle regulatório. Em ainda outra modalidade, uma célula hospedeira é fornecida com

25 preendendo o vetor anteriormente mencionado ou a molécula de ácido nucléico anteriormente mencionada. Em ainda outra modalidade, um método de usar a célula hospedeira anteriormente mencionada para produzir um anticorpo antagonista é fornecido, compreendendo cultivar a célula hospedeira sob condições adequadas e recuperar o anticorpo. Em outra modalidade,

30 o anticorpo antagonista produzido pelo método anteriormente mencionado é fornecido.

Em outra modalidade da invenção, um anticorpo antagonista

anteriormente mencionado é fornecido, o qual é purificado para pelo menos 95% de homogeneidade em peso. Em ainda outra modalidade, uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo antagonista anteriormente mencionado e um veículo farmacêuticamente aceitável é fornecido. Em ainda outra modalidade, a kit é fornecido compreendendo um anticorpo antagonista anteriormente mencionado compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da invenção, embalado em um recipiente, em que o kit opcionalmente contém um segundo agente terapêutico, e também compreendendo um rótulo ligado a ou embalado com o recipiente, o rótulo descrevendo os conteúdos do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções considerando o uso dos conteúdos do recipiente para tratar uma doença ou distúrbio relacionado por EphB3. Em outra modalidade, o kit anteriormente mencionado é fornecido onde o recipiente é um frascote ou frasco ou seringa pré-carregada.

#### 15 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a linha de risco para a cadeia leve e cadeia pesada XPA.04.017, XPA.04.031, e XPA.04.019 (H = risco elevado, M = risco moderado, L = baixo risco), a sequência de aminoácido de região variável de cadeia leve e cadeia pesada XPA.04.017, XPA.04.031, e XPA.04.019 (SEQ ID NOs: 3-8), e a localização de CDR H1, H2 e H3 dentro da sequência de aminoácido.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção fornece anticorpos antagonistas específicos de EphB3, formulações farmacêuticas contendo tais anticorpos antagonistas, métodos de preparar os anticorpos antagonistas e formulações farmacêuticas, e métodos de tratar pacientes com as formulações e compostos farmacêuticos. Tais anticorpos antagonistas podem inibir a ligação de um ligante (por exemplo, Efrina B2, Efrina B1, Efrina B3) a EphB3, inibir dimerização de EphB3, inibir Fosforilação de EphB3, inibir ativação de receptor de EphB3 induzida por ligante, e/ou modular adesão de célula-célula mediada por EphB3. Uma classe de anticorpos antagonistas fornecida aqui inibem a ligação de Efrina B2 ao receptor de EphB3 e pode agir como um inibidor compe-

titivo. Outra classe de anticorpos antagonistas fornecida aqui não inibem A ligação de Efrina B2 ao receptor de EphB3 porém todavia reduz o nível de fosforilação e/ou dimerização de EphB3, uma medida de ativação de receptor. Similarmente, outra classe de anticorpos antagonistas fornecida aqui inibem a ligação de Efrina B1 e/ou Efrina B3 ao receptor de EphB3 e pode agir como um inibidor competitivo. Still Outra classe de anticorpos antagonistas fornecida aqui não inibem a ligação de Efrina B1 e/ou Efrina B3 ao receptor de EphB3, porém todavia reduz o nível de fosforilação e/ou dimerização de EphB3.

10 Em algumas modalidades anticorpos antagonistas da presente invenção ligam um epítopo descrito aqui, ou uma porção do mesmo. Em algumas modalidades, ligação do anticorpo antagonista ao receptor inibem a fosforilação do receptor. Em algumas modalidades, ligação do anticorpo antagonista ao receptor inibem a ligação de um ligante a EphB3. Em algumas modalidades, ligação do anticorpo antagonista ao receptor inibem dimerização de EphB3. Em algumas modalidades, ligação do anticorpo antagonista ao receptor inibem ativação de receptor induzida por ligante. A ativação de receptor (isto é, sinalização) pode ser determinada por técnicas conhecidas na arte. Por exemplo, a ativação de receptor pode ser determinada detectando-se a fosforilação (por exemplo, tirosina ou serina/treonina) do receptor ou seu substrato por imunoprecipitação seguido por análise de mancha do Oeste. Em algumas modalidades, anticorpos antagonistas são fornecidos que inibem a atividade de ligante ou atividade de receptor em pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% da atividade na ausência do anticorpo.

Em algumas modalidades os anticorpos de EphB3 inibem a ligação de EphB3 às proteínas adaptoras intracelulares.

Como aqui usado, o termo "proteínas adaptoras intracelulares" refere-se a uma proteína que conecta diferentes segmentos de um complexo de sinalização. O adaptor pode ou não ter atividade enzimática. Exemplos de proteínas adaptoras são conhecidos por aqueles versados na técnica.

Por exemplo, Grb2 é uma proteína adaptora que não tem atividade enzimática intrínseca, enquanto que a RasGAP é uma proteína adaptora que tem atividade enzimática.

Diversos anticorpos de murino ou quimerizados preferidos com alta afinidade e potência quando avaliados por ensaios *in vitro* são modificados para ficarem menos imunogênicos em humanos com base no método Human Engineering<sup>TM</sup> de Studnicka e outro. Em síntese, os resíduos de aminoácido expostos na superfície de regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve são modificados para resíduos humanos em posições determinadas serem improváveis de adversamente realizarem ou a ligação de antígeno ou duplicação da proteína, ao mesmo tempo que reduzindo sua imunogenicidade com respeito a um ambiente humano. Genes sintéticos codificando regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve modificada são construídos e ligados a sequências de codificação para as regiões constantes de cadeia pesada gama humana e/ou cadeia leve kappa. Quaisquer regiões constantes de cadeia pesada e cadeia leve humanas podem ser usadas em combinação com as regiões variáveis de anticorpo Human Engineered<sup>TM</sup>. Os genes de cadeia pesada e leve humanos são introduzidos em células mamíferas e os produtos de imunoglobulina recombinante resultantes são obtidos e caracterizados.

Antagonistas de anticorpos exemplares de acordo com a invenção incluem XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019. Os seguintes hibridomas de secreção de anticorpo foram depositados com a American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (USA), de acordo com as provisões do Budapest Treaty, de 17 de novembro de 2006:

| <u>NOME DO HYBRIDOMA</u> | <u>NÚMERO DE DEPÓSITO ATCC</u> |
|--------------------------|--------------------------------|
| XHA.05.172               |                                |
| XHA.05.849               |                                |

As definições abaixo são fornecidas como um auxílio no entendimento da invenção mais completamente.

#### Definições Gerais

O "EphB3" humano de antígeno alvo, como aqui usado, refere-se a um polipeptídeo humano tendo substancialmente a mesma sequência de aminoácido como SEQ ID NO: 2 e variantes alélicas de ocorrência natural do mesmo. "ECD de EphB3" como aqui usado refere-se à porção extracelular de EphB3 representada pelos aminoácidos 37 - 558 da SEQ ID NO: 2.

"Uma doença ou distúrbio relacionado com EphB3" como aqui usado refere-se a doença celíaca ou outras doenças associada com proliferação celular intestinal patológica; doença angiogênica ou outras doenças associada com pathological vascular a proliferação celular, por exemplo, ocular doenças angiogênicas tais como retinopatia diabética ou retinopatia de prematuridade, ou degeneração macular relacionada com a idade, bem como psoríase, artrite reumatóide, ateroma, restenose arterial, hemangioma, doenças autoimunes, angiogênese associada com outra inflamação aguda ou crônica, formação de cicatrização ou adesão, ou endometriose; dano neuronal, por exemplo, por dano traumático, por isquemia vascular local ou cerebral, por toxinas, ou por infecção incluindo infecção viral, bacteriana, fúngica ou parasítica; neurodegenerative doenças, por exemplo, doença de Parkinson, Doença de Huntington, Doença de Alzheimer, demência senil, Esclerose Lateral Amiloide (ALS), Esclerose Múltipla (MS), neuropatia periférica, atrofia muscular espinhal, doença de Creutzfeldt-Jakob, ou demência de AIDS; ou câncer, por exemplo, câncer de pulmão, ovário, esofágico, cólon ou mama.

"Tratamento" é uma intervenção realizada com a intenção de prevenir o desenvolvimento ou alterar a patologia de um distúrbio. Consequentemente, "tratamento" refere-se tanto a tratamento terapêutico quanto profilático ou medidas preservativas. Aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles já com o distúrbio, bem como aqueles em que o distúrbio deve ser prevenido. Tratamento de pacientes sofrendo de sintomas clínicos, bioquímicos, radiológicos ou subjetivos da doença podem incluir aliviar alguns ou todos os tais sintomas ou reduzir a predisposição à doença.

"Mamífero" para os propósitos de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais

domésticos e de fazenda, e animais de zoológico, esportes, ou de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. Preferivelmente, o mamífero é humano.

Como aqui usada, a frase "quantidade terapeuticamente eficaz" é entendida referir-se a uma quantidade de anticorpo terapêutico ou profilático que seria apropriada para uma modalidade da presente invenção, que eliciará o efeito ou resposta terapêutica ou profilática desejada, incluindo aliviar alguns ou todos os tais sintomas de doença ou reuzir a predisposição à doença, quando administrada de acordo com o regime de tratamento desejado.

#### Antibodies

O termo "imuno específico" ou "especificamente ligando" significa que o anticorpo liga-se a EphB3 ou seu ECD com um  $K_a$  maior do que ou igual a cerca de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , preferivelmente maior do que ou igual a cerca de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , mais preferivelmente maior do que ou igual a cerca de  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . O anticorpo pode ter afinidade substancialmente maior para o antígeno alvo em comparação à outras moléculas não relacionadas. O anticorpo pode also ter afinidade substancialmente maior para o antígeno alvo em comparação à ortólogos ou homólogos, por exemplo, pelo menos 1,5-vezes, 2-vezes, 5-vezes, 10-vezes, 100-vezes,  $10^3$ -vezes,  $10^4$ -vezes,  $10^5$ -vezes,  $10^6$ -vezes ou maior afinidade relativa para o antígeno alvo. Alternativamente, pode ser útil para o anticorpo interagir com um homólogo ou ortólogo conhecido.

Anticorpos da invenção podem também ser caracterizados por uma afinidade ( $K_D$ ) de pelo menos  $10^{-4} \text{ M}$ , preferivelmente pelo menos cerca de  $10^{-4} \text{ M}$  a cerca de  $10^{-12} \text{ M}$ , mais preferivelmente pelo menos cerca de  $10^{-5} \text{ M}$ ,  $10^{-6} \text{ M}$ ,  $10^{-7} \text{ M}$  ou  $10^{-8} \text{ M}$ ,  $10^{-9} \text{ M}$ ,  $10^{-10} \text{ M}$ , ou  $10^{-11} \text{ M}$ . A afinidade apropriada para os anticorpos pode variar dependendo da aplicação terapêutica. Tais afinidades podem ser facilmente determinadas usando técnicas convencionais, tais como por diálise de equilíbrio; usando o instrumento BIAcore 2000, usando procedimentos gerais delineados pelo fabricante; por radioimunoensaio usando antígeno alvo radiorrotulado; ou por outro método conhecido pelo técnico versado. Os dados de afinidade podem ser analisados,

por exemplo, pelo método de Scatchard e outro, Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949).

Por "anticorpo antagonista" entende-se uma molécula de anticorpo que é capaz de inibir a ativação de EphB3. Consequentemente, um anticorpo anti-EphB3 "antagonista" é capaz de inibir a ligação a EphB3, diminuindo a atividade de fosforilação, diminuindo a oligomerização de EphB3, diminuindo a internalização de EphB3, e/ou diminuindo a sinalização a jusante de EphB3. O termo "anticorpo" é usado no sentido mais amplo e inclui anticorpos totalmente montados, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), fragmentos de anticorpo que podem se ligar a antígeno (por exemplo, Fab', F'(ab)2, Fv, diacorpos, anticorpos de cadeia única), e peptídeos recombinantes compreendendo os anteriores, contanto que eles exibem a atividade biológica desejada. Fragmentos de anticorpo podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinantes ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos e são descritos também abaixo. Exemplos não limitantes de anticorpos monoclonais incluem de murino, quiméricos, humanizados, humanos, e imunoglobulinas Human Engineered™, anticorpos, proteínas de fusão quiméricas tendo sequências derivadas de imunoglobulinas, ou muteínas ou derivados dos mesmos, cada qual descrito também abaixo. Multímeros ou agregados de moléculas intactas e/ou fragmentos, incluindo anticorpos quimicamente derivados, são contemplados. Anticorpos de qualquer classe ou subclasse de isótipo são contemplados de acordo com a presente invenção.

O termo "anticorpo monoclonal" como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para mutações de ocorrência natural possíveis ou modificações pós-translacionais alternativas que podem estar presente em menores quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos; ao contrário das preparações de anticorpo convencionais (policlonais) que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinan-

tes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra uma única determinante no antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo fato de que eles são sintetizados pela cultura homogênea, não contaminada por outras imunoglobulinas com diferentes especificidades e características.

O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser construído como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e outro, 1975 Nature, 256:495, ou pode ser feito por métodos de DNA recombinante (veja, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser recombinantes, quiméricos, humanizados, humanos, Human Engineered™, ou fragmentos de anticorpo, por exemplo.

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e recuperado de um componente de seu ambiente natural. Os componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interferem com usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteínicos ou não proteínicos. Em modalidades preferidas, o anticorpo será purificado (1) para mais do que 95% em peso de anticorpo, como determinado pelo método Lowry, e mais preferivelmente mais do que 99% em peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido de terminal N ou interna pelo uso de um seqüenciador de xícara giratória, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando azul Coomassie ou, preferivelmente, mancha prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes visto que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Ordinariamente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado em pelo menos uma etapa de purificação.

Uma "imunoglobulina" ou "anticorpo nativo" é uma glicoproteína

tetramérica. Em uma imunoglobulina de ocorrência natural, cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção de terminal amino de cada cadeia inclui uma região "variável" ("V") de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsável por reconhecimento de antígeno. A porção de terminal carbóxi de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetora. As imunoglobulinas podem ser designadas para diferentes classes dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas. As cadeias pesadas são classificadas como mu ( $\mu$ ), delta ( $\Delta$ ), gama ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ), e épsilon ( $\epsilon$ ), e definem os isótipos do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Diversos destes podem ser também divididos em subclasses ou isótipos, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Diferentes isótipos têm diferentes funções efetoras; por exemplo, os isótipos IgG1 e IgG3 têm atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). As cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves kapa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ). Dentro de cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são ligadas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" de cerca de 10 ou mais aminoácidos. Veja geralmente, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Para uma descrição detalhada da estrutura e geração de anticorpos, veja Roth, D.B., e Craig, N.L., *Cell*, 94:411-414 (1998), aqui incorporado por referência em sua totalidade. Em síntese, o processo para gerar DNA codificando as sequências de imunoglobulina de cadeia pesada e leve ocorre primariamente no desenvolvimento de células B. Antes da redistribuição e ligação de vários segmentos de gene de imunoglobulina, os segmentos de gene V, D, J e constante (C) são encontrados geralmente em proximidade relativamente íntima sobre um único cromossoma. Durante a diferenciação de célula B, um de cada dos membros da família apropriada dos segmentos de gene V, D, J (ou apenas V e J no caso de genes de cadeia

leve) são combinados para formar regiões variáveis funcionalmente redistribuídas dos genes de imunoglobulina pesada e leve. Este processo de redistribuição de segmento de gene parece ser sequencial. Primeiro, ligações D-a-J de cadeia pesada são feitas, seguidas por ligações de V-a-DJ de cadeia pesada e ligações V-a-J de cadeia leve. Além da redistribuição de segmentos V, D e J, outra diversidade é gerada no repertório primário de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina por meio de recombinação variável nas localizações onde os segmentos V e J na cadeia leve são ligados e onde os segmentos D e J de uma cadeia pesada são ligados. Tal variação na cadeia leve tipicamente ocorre dentro do último códon do segmento de gene V e o primeiro códon do segmento J. Imprecisão similar em ligação ocorre no cromossoma de cadeia pesada entre os segmentos D e J<sub>H</sub> e pode estender-se além de tanto quanto 10 nucleotídeos. Além disso, diversos nucleotídeos podem ser inseridos entre os segmentos de gene D e J<sub>H</sub> e entre o V<sub>H</sub> e D que não são codificados por DNA genômico. A adição destes nucleotídeos é conhecida como diversidade de região N. O efeito puro de tais redistribuições nos segmentos de gene de região variável e a recombinação variável que pode ocorrer durante tais ligações é a produção de um repertório de anticorpo primário.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo de tamanho natural intacto, preferivelmente a ligação de antígeno ou região variável do anticorpo intacto, e incluem anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. Exemplos não-limitantes de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticorpo de domínio (dAb), fragmentos de região de determinação de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única (scFv), fragmentos de anticorpo de cadeia única, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, anticorpos lineares (Zapata e outro, *protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995)); anticorpos recombinantes quelantes, tricorpos ou bicorpos, intracorpos, nanocorpos, imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs), uma proteína de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação de antígeno, um anticorpo camelizado, um anticorpo contendo VHH, ou muteínas ou derivados dos mesmos, e polipeptídeos que

contêm pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação de antígeno específico ao polipeptídeo, tal como uma sequência de CDR, contanto que o anticorpo retenha a atividade biológica desejada.

5 A digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, chamados fragmentos "Fab", cada qual com um sítio de ligação de antígeno único, e um fragmento residual "Fc", cujo nome reflete sua capacidade de cristalizar-se facilmente. O tratamento de pepsina produz um fragmento de  $F(ab')_2$  que tem dois fragmentos "Fv". Um  
10 fragmento "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação e reconhecimento de antígeno completo. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e uma leve em associação não covalente estreita. Está nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interage para definir um sítio de ligação de antígeno sobre a  
15 superfície do dímero VH VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação a antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de uma Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar-se a antígeno.

20 Os fragmentos de anticorpo "Cadeia única Fv" ou "sFv" ou "scFv" compreendem os domínios VH e VL de anticorpo, onde estes domínios estão presente em uma única cadeia de polipeptídeo. Preferivelmente, o polipeptídeo Fv também compreende uma ligação de polipeptídeo entre os domínios VH e VL que possibilitam a Fv formar a estrutura desejada para  
25 ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv veja Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. I 13, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994).

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos  
30 Fab diferem dos fragmentos Fab' pela adição de alguns resíduos na terminação carbóxi de um domínio CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação de anticorpo. Fab'-SH é a designação in-

clusa para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes transportam um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo F(ab')<sub>2</sub> originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas de articulação entre eles.

5 O termo região "hipervariável" refere-se aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácido de uma "região de determinação de complementaridade" ou CDR [isto é, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-10 65 (H2) e 95-102 (H3) em um domínio variável de cadeia pesada como descrito por Kabat e outro, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] e/ou aqueles resíduos de uma alça hipervariável (*isto é*, resíduos 26-15 32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) em um domínio variável de cadeia pesada como descrito por [Chothia e outro, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)].

"Estrutura" ou resíduos FR são aqueles resíduos de domínio variável exceto os resíduos de região hipervariável.

20 A frase "região constante" refere-se à porção da molécula de anticorpo que confere funções efectoras.

A frase "anticorpo quimérico," como aqui usada, refere-se a um anticorpo contendo sequência derivada de dois anticorpos diferentes (veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos n° 4.816.567) que tipicamente origina-se de diferentes espécies. Mais tipicamente, anticorpos quiméricos 25 compreendem fragmentos de anticorpo humano e de murino, geralmente regiões constantes humanas e variáveis de camundongo.

O termo "muteína" refere-se à sequência de polipeptídeo de um anticorpo que contenha pelo menos uma substituição, deleção ou inserção de aminoácido na região variável ou na porção equivalente à região variável, 30 contanto que a muteína retenha a afinidade de ligação desejada ou atividade biológica. As muteínas podem ser substancialmente homólogas ou substancialmente idênticas ao anticorpo origem.

O termo "derivado" quando usado com relação aos anticorpos da invenção refere-se a anticorpos covalentemente modificados por tais técnicas como ubiquitinação, conjugação aos agentes terapêuticos ou diagnósticos, rotulagem (por exemplo, com radionuclídeos ou várias enzimas), ligação de polímero covalente tal como pegilação (derivatização com polietileno glicol) e inserção ou substituição por síntese química de aminoácidos não-naturais. Os derivados da invenção reterão as propriedades de ligação de moléculas não derivatizadas da invenção .

Quando usado aqui, o termo "anticorpo" especificamente inclui qualquer um dos seguintes que retém a capacidade de ligar-se à porção extracelular de EphB3:

1) uma muteína de aminoácido de um anticorpo origem tendo uma sequência de aminoácido representada na Figura 1, incluindo muteínas compreendendo uma sequência de aminoácido pesada de cadeia variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga à sequência de aminoácido origem, e/ou compreendendo uma sequência de aminoácido leve de cadeia variável que é pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% homóloga à sequência de aminoácido origem, levando em consideração aminoácidos similares para a determinação de homologia;

2) polipeptídeos de ligação de EphB3 compreendendo uma ou mais regiões de determinação complementar (CDRs) de um anticorpo origem tendo uma sequência de aminoácido representada na Figura 1, preferivelmente compreendendo pelo menos a CDR3 da cadeia pesada, e preferivelmente compreendendo duas ou mais, ou três ou mais, ou quatro ou mais, ou cinco ou mais, ou todas as seis CDRs;

3) anticorpos Human Engineered<sup>TM</sup> gerados alterando-se a sequência origem de acordo com os métodos representados em Studnicka e outro, Patente dos Estados Unidos nº 5.766.886 e Exemplo 8 incluso, usando a numeração Kabat para identificar resíduos de baixo, moderado e alto risco; tais anticorpos compreendendo pelo menos uma das seguintes cadeias pesadas e pelo menos uma das seguintes cadeias leves: (a) a cadeia

pesada em que todos os resíduos de roedor de baixo risco que diferem dos resíduos correspondentes em uma sequência de imunoglobulina de referência humana foi modificada para ficar igual ao resíduo humano na sequência de imunoglobulina de referência humana ou (b) a cadeia pesada em que todos os resíduos de roedor de baixo e moderado risco foram modificados, se necessário, para ficar iguais aos resíduos como na sequência de imunoglobulina de referência humana, (c) uma cadeia leve em que todos os resíduos de baixo risco foram modificados, se necessário, para ficar resíduos iguais à sequência de imunoglobulina de referência humana ou (b) a cadeia leve em que todos os resíduos de baixo e moderado risco foram modificados, se necessário, para os mesmos resíduos de uma sequência de imunoglobulina humana

4) muteínas dos anticorpos anteriormente mencionados em parágrafo precedente (3) compreendendo uma cadeia pesada ou leve tendo pelo menos 60% de identidade de sequência de aminoácido com a cadeia leve de roedor original, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e o mais preferivelmente pelo menos 95%, incluindo por exemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, e 100% identical;

5) polipeptídeos de ligação de EphB3 compreendendo os resíduos de alto risco de uma ou mais CDRs do anticorpo de roedor, e preferivelmente compreendendo resíduos de alto risco de duas ou mais, ou três ou mais, ou quatro ou mais, ou cinco ou mais, de todas as seis CDRs, e opcionalmente compreendendo uma ou mais mudanças nos resíduos de baixo ou moderado risco;

Por exemplo, compreendendo uma ou mais mudanças em um resíduo de baixo risco e substituições conservativas em um resíduo de risco moderado, ou

Por exemplo, retendo os resíduos de aminoácido de moderado e alto risco e compreendendo uma ou mais mudanças em um resíduo de baixo risco,

Onde as mudanças incluem inserções, deleções ou substituições e podem ser substituições conservativas ou podem causar o anticorpo construído estar mais próximo em sequência a uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada humana, uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada de linha germinativa humana, uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada humana de consenso, ou uma sequência de cadeia leve ou cadeia pesada de linha germinativa humana de consenso. Tais mudanças contempladas podem também ser exibidas em forma de sequência como segue. Em uma sequência hipotética de AKKLVHTPYSFKEDEF, onde o risco respectivo repartido para cada resíduo de acordo com Studnicka e outro, Patente dos Estados Unidos nº 5.766.886, é HMLHMLHMLHMLHML (H = elevado, M = médio, L = baixo), mudanças exemplares aos resíduos de baixo risco da sequência hipotética podem ser exibidas como: AKXLVXTPXSF-XEDX onde X é qualquer aminoácido, ou alternativamente, onde X é uma substituição conservativa do resíduo original naquela posição, e mudanças exemplares aos resíduos de baixo e moderado risco podem ser exibidas similarmente, por exemplo, AYXLYXTYXSXYEYX, onde X é qualquer aminoácido e Y é uma substituição conservativa do resíduo original naquela posição.

O termo "anticorpo de competição" inclui

1) um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epítipo de EphB3 como o anticorpo XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019, por exemplo, como determinado por meio de cristalografia de raio-X; e

2) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019 by mais do que 75%, mais do que 80%, ou mais do que 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95%.

Anticorpos da invenção preferivelmente ligam-se ao ECD de EphB3 com uma afinidade  $K_D$  de pelo menos  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  ou  $10^{-11}$  M ou menos e preferivelmente inibem a fosforilação de receptor, sinalização, ligação de ligante, dimerização de EphB3, ativação de receptor induzida por

ligante, e/ou adesão de célula-célula mediada por EphB3.

Opcionalmente, qualquer anticorpo quimérico, humano ou humanizado publicamente descrito antes da data de depósito do mesmo, ou descrito em um pedido depositado antes da data de depósito do mesmo, é  
5 excluído do escopo da invenção .

Anticorpo monoclonal de "não-roedor" é qualquer anticorpo, como amplamente definido aqui, que não é um anticorpo monoclonal de roedor intacto completo gerado por um hibridoma de roedor. Desse modo, anticorpos de não-roedor especificamente incluem, porém não estão limitados a,  
10 muteínas de anticorpos de roedor, fragmentos de anticorpo de roedor, anticorpos lineares, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos Human Engineered™ e anticorpos humanos, incluindo anticorpos humanos produzidos de animais transgênicos ou por meio de tecnologia de exibição de fago. Similarmente, anticorpos não-murinos incluem porém não estão  
15 limitados à muteínas de anticorpos de murino, fragmentos de anticorpo de murino, anticorpos lineares, quiméricos, humanizados, Human Engineered™ e anticorpos humanos.

#### Antígeno Alvo

O antígeno alvo a ser usado para a produção de anticorpos pode  
20 ser, por exemplo, as porção extracelular de EphB3, ou um fragmento das mesmas que retém o epítipo desejado, opcionalmente fundido a outro polipeptídeo que permite o epítipo ser exibido em sua conformação nativa. Alternativamente, o EphB3 intacto expresso na superfície de células pode ser usado para gerar anticorpos. Tais células podem ser transformadas para  
25 expressar o EphB3 ou podem ser outras células de ocorrência natural que expressam EphB3. Outras formas de polipeptídeos de EphB3 úteis para gerar anticorpos serão evidentes para aqueles versados na técnica.

Vários domínios de EphB3 incluem o domínio de ligação de ligante (resíduos de aminoácido 39-212 de SEQ ID NO: 2), o domínio TNFR  
30 (resíduos de aminoácido 256-331 de SEQ ID NO: 2), o primeiro domínio de fibronectina (resíduos de aminoácido 340-435 de SEQ ID NO: 2), e o segundo domínio de fibronectina (resíduos de aminoácido 453-535 de SEQ ID NO:

- 2). Epítomos exemplares do domínio de ligação de ligante de EphB3 são selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOS:9-143. Epítomos exemplares do domínio TNFR de EphB3 são selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOS:159-257. Epítomos exemplares do primeiro domínio de fibronectina de EphB3 são selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOS:257-299. Epítomos exemplares do segundo domínio de fibronectina de EphB3 são selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NOS:378-419.

10 A Tabela 1 abaixo fornece regiões de EphB3 (SEQ ID NO:2) que foram identificadas como epítomos lineares adequados para reconhecimento por anticorpos anti EphB3.

**Tabela 1**

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítomo | epítomo   | Localização de seq. aa | Epítomo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|-----------|------------------------|-----------|------------|
| 98-115              | 8-mer             | WRRDVQRV  | 98-105                 | 1         | 9          |
| 98-115              | 8-mer             | RRDVQRVY  | 99-106                 | 2         | 10         |
| 98-115              | 8-mer             | RDVQRVYV  | 100-107                | 3         | 11         |
| 98-115              | 8-mer             | DVQRVYVE  | 101-108                | 4         | 12         |
| 98-115              | 8-mer             | VQRVYVEL  | 102-109                | 5         | 13         |
| 98-115              | 8-mer             | QRVYVELK  | 103-110                | 6         | 14         |
| 98-115              | 8-mer             | RVYVELKF  | 104-111                | 7         | 15         |
| 98-115              | 8-mer             | VYVELKFT  | 105-112                | 8         | 16         |
| 98-115              | 8-mer             | YVELKFTV  | 106-113                | 9         | 17         |
| 98-115              | 8-mer             | VELKFTVR  | 107-114                | 10        | 18         |
| 98-115              | 8-mer             | ELKFTVRD  | 108-115                | 11        | 19         |
| 98-115              | 9-mer             | WRRDVQRVY | 98-106                 | 12        | 20         |
| 98-115              | 9-mer             | RRDVQRVYV | 99-107                 | 13        | 21         |
| 98-115              | 9-mer             | RDVQRVYVE | 100-108                | 14        | 22         |
| 98-115              | 9-mer             | DVQRVYVEL | 101-109                | 15        | 23         |
| 98-115              | 9-mer             | VQRVYVELK | 102-110                | 16        | 24         |
| 98-115              | 9-mer             | QRVYVELKF | 103-111                | 17        | 25         |
| 98-115              | 9-mer             | RVYVELKFT | 104-112                | 18        | 26         |
| 98-115              | 9-mer             | VYVELKFTV | 105-113                | 19        | 27         |
| 98-115              | 9-mer             | YVELKFTVR | 106-114                | 20        | 28         |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo    | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 98-115              | 9-mer             | VELKFTVRD  | 107-115                | 21        | 29         |
| 98-115              | 10-mer            | WRRDVQRVYV | 98-107                 | 22        | 30         |
| 98-115              | 10-mer            | RRDVQRVYVE | 99-108                 | 23        | 31         |
| 98-115              | 10-mer            | RDVQRVYVEL | 100-109                | 24        | 32         |
| 98-115              | 10-mer            | DVQRVYVELK | 101-110                | 25        | 33         |
| 98-115              | 10-mer            | VQRVYVELKF | 102-111                | 26        | 34         |
| 98-115              | 10-mer            | QRVYVELKFT | 103-112                | 27        | 35         |
| 98-115              | 10-mer            | RVYVELKFTV | 104-113                | 28        | 36         |
| 98-115              | 10-mer            | VYVELKFTVR | 105-114                | 29        | 37         |
| 98-115              | 10-mer            | YVELKFTVRD | 106-115                | 30        | 38         |
| 152-194             | 8-mer             | NPYVKVDT   | 152-159                | 1         | 39         |
| 152-194             | 8-mer             | PYVKVDTI   | 153-160                | 2         | 40         |
| 152-194             | 8-mer             | YVKVDTIA   | 154-161                | 3         | 41         |
| 152-194             | 8-mer             | VKVDTIAP   | 155-162                | 4         | 42         |
| 152-194             | 8-mer             | KVDTIAPD   | 156-163                | 5         | 43         |
| 152-194             | 8-mer             | VDTIAPDE   | 157-164                | 6         | 44         |
| 152-194             | 8-mer             | DTIAPDES   | 158-165                | 7         | 45         |
| 152-194             | 8-mer             | TIAPDESF   | 159-166                | 8         | 46         |
| 152-194             | 8-mer             | IAPDESFS   | 160-167                | 9         | 47         |
| 152-194             | 8-mer             | APDESFSR   | 161-168                | 10        | 48         |
| 152-194             | 8-mer             | PDESFSRL   | 162-169                | 11        | 49         |
| 152-194             | 8-mer             | DESFSRLD   | 163-170                | 12        | 50         |
| 152-194             | 8-mer             | ESFSRLDA   | 164-171                | 13        | 51         |
| 152-194             | 8-mer             | SFSRLDAG   | 165-172                | 14        | 52         |
| 152-194             | 8-mer             | FSRLDAGR   | 166-173                | 15        | 53         |
| 152-194             | 8-mer             | SRLDAGRV   | 167-174                | 16        | 54         |
| 152-194             | 8-mer             | RLDAGRVN   | 168-175                | 17        | 55         |
| 152-194             | 8-mer             | LDAGRVNT   | 169-176                | 18        | 56         |
| 152-194             | 8-mer             | DAGRVNTK   | 170-177                | 19        | 57         |
| 152-194             | 8-mer             | AGRVNTKV   | 171-178                | 20        | 58         |
| 152-194             | 8-mer             | GRVNTKVR   | 172-179                | 21        | 59         |
| 152-194             | 8-mer             | RVNTKVRS   | 173-180                | 22        | 60         |
| 152-194             | 8-mer             | VNTKVRSF   | 174-181                | 23        | 61         |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo   | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|-----------|------------------------|-----------|------------|
| 152-194             | 8-mer             | NTKVRSGF  | 175-182                | 24        | 62         |
| 152-194             | 8-mer             | TKVRSGFP  | 176-183                | 25        | 63         |
| 152-194             | 8-mer             | KVRSGGPL  | 177-184                | 26        | 64         |
| 152-194             | 8-mer             | VRSFGPLS  | 178-185                | 27        | 65         |
| 152-194             | 8-mer             | RSFGPLSK  | 179-186                | 28        | 66         |
| 152-194             | 8-mer             | SFGPLSKA  | 180-187                | 29        | 67         |
| 152-194             | 8-mer             | FGPLSKAG  | 181-188                | 30        | 68         |
| 152-194             | 8-mer             | GPLSKAGF  | 182-189                | 31        | 69         |
| 152-194             | 8-mer             | PLSKAGFY  | 183-190                | 32        | 70         |
| 152-194             | 8-mer             | LSKAGFYL  | 184-191                | 33        | 71         |
| 152-194             | 8-mer             | SKAGFYLA  | 185-192                | 34        | 72         |
| 152-194             | 8-mer             | KAGFYLAF  | 186-193                | 35        | 73         |
| 152-194             | 8-mer             | AGFYLAQ   | 187-194                | 36        | 74         |
| 152-194             | 9-mer             | NPYVKVDTI | 152-160                | 37        | 75         |
| 152-194             | 9-mer             | PYVKVDTIA | 153-161                | 38        | 76         |
| 152-194             | 9-mer             | YVKVDTIAP | 154-162                | 39        | 77         |
| 152-194             | 9-mer             | VKVDTIAPD | 155-163                | 40        | 78         |
| 152-194             | 9-mer             | KVDTIAPDE | 156-164                | 41        | 79         |
| 152-194             | 9-mer             | VDTIAPDES | 157-165                | 42        | 80         |
| 152-194             | 9-mer             | DTIAPDES  | 158-166                | 43        | 81         |
| 152-194             | 9-mer             | TIAPDESFS | 159-167                | 44        | 82         |
| 152-194             | 9-mer             | IAPDESFSR | 160-168                | 45        | 83         |
| 152-194             | 9-mer             | APDESFSRL | 161-169                | 46        | 84         |
| 152-194             | 9-mer             | PDESFSRLD | 162-170                | 47        | 85         |
| 152-194             | 9-mer             | DESFSRLDA | 163-171                | 48        | 86         |
| 152-194             | 9-mer             | ESFSRLDAG | 164-172                | 49        | 87         |
| 152-194             | 9-mer             | SFSRLDAGR | 165-173                | 50        | 88         |
| 152-194             | 9-mer             | FSRLDAGRV | 166-174                | 51        | 89         |
| 152-194             | 9-mer             | SRLDAGRVN | 167-175                | 52        | 90         |
| 152-194             | 9-mer             | RLDAGRVNT | 168-176                | 53        | 91         |
| 152-194             | 9-mer             | LDAGRVNTK | 169-177                | 54        | 92         |
| 152-194             | 9-mer             | DAGRVNTKV | 170-178                | 55        | 93         |
| 152-194             | 9-mer             | AGRVNTKVR | 171-179                | 56        | 94         |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo     | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|-------------|------------------------|-----------|------------|
| 152-194             | 9-mer             | GRVNTKVR    | 172-180                | 57        | 95         |
| 152-194             | 9-mer             | RVNTKVRSF   | 173-181                | 58        | 96         |
| 152-194             | 9-mer             | VNTKVRSGF   | 174-182                | 59        | 97         |
| 152-194             | 9-mer             | NTKVRSGFP   | 175-183                | 60        | 98         |
| 152-194             | 9-mer             | TKVRSGGPL   | 176-184                | 61        | 99         |
| 152-194             | 9-mer             | KVRSGGPLS   | 177-185                | 62        | 100        |
| 152-194             | 9-mer             | VRSFGPLSK   | 178-186                | 63        | 101        |
| 152-194             | 9-mer             | RSFGPLSKA   | 179-187                | 64        | 102        |
| 152-194             | 9-mer             | SFGPLSKAG   | 180-188                | 65        | 103        |
| 152-194             | 9-mer             | FGPLSKAGF   | 181-189                | 66        | 104        |
| 152-194             | 9-mer             | GPLSKAGFY   | 182-190                | 67        | 105        |
| 152-194             | 9-mer             | PLSKAGFYL   | 183-191                | 68        | 106        |
| 152-194             | 9-mer             | LSKAGFYLA   | 184-192                | 69        | 107        |
| 152-194             | 9-mer             | SKAGFYLAF   | 185-193                | 70        | 108        |
| 152-194             | 9-mer             | KAGFYLAFQ   | 186-194                | 71        | 109        |
| 152-194             | 10-mer            | NPYVKVDITIA | 152-161                | 72        | 110        |
| 152-194             | 10-mer            | PYVKVDITIAP | 153-162                | 73        | 111        |
| 152-194             | 10-mer            | YVKVDITIAPD | 154-163                | 74        | 112        |
| 152-194             | 10-mer            | VKVDITIAPDE | 155-164                | 75        | 113        |
| 152-194             | 10-mer            | KVDITIAPDES | 156-165                | 76        | 114        |
| 152-194             | 10-mer            | VDITIAPDESF | 157-166                | 77        | 115        |
| 152-194             | 10-mer            | DTIAPDESFS  | 158-167                | 78        | 116        |
| 152-194             | 10-mer            | TIAPDESFSR  | 159-168                | 79        | 117        |
| 152-194             | 10-mer            | IAPDESFSRL  | 160-169                | 80        | 118        |
| 152-194             | 10-mer            | APDESFSRLD  | 161-170                | 81        | 119        |
| 152-194             | 10-mer            | PDESFSRLDA  | 162-171                | 82        | 120        |
| 152-194             | 10-mer            | DESFSRLDAG  | 163-172                | 83        | 121        |
| 152-194             | 10-mer            | ESFSRLDAGR  | 164-173                | 84        | 122        |
| 152-194             | 10-mer            | SFSRLDAGRV  | 165-174                | 85        | 123        |
| 152-194             | 10-mer            | FSRLDAGRVN  | 166-175                | 86        | 124        |
| 152-194             | 10-mer            | SRLDAGRVNT  | 167-176                | 87        | 125        |
| 152-194             | 10-mer            | RLDAGRVNTK  | 168-177                | 88        | 126        |
| 152-194             | 10-mer            | LDAGRVNTKV  | 169-178                | 89        | 127        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo     | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|-------------|------------------------|-----------|------------|
| 152-194             | 10-mer            | DAGRVNTKVR  | 170-179                | 90        | 128        |
| 152-194             | 10-mer            | AGRVNTKVRS  | 171-180                | 91        | 129        |
| 152-194             | 10-mer            | GRVNTKVRSF  | 172-181                | 92        | 130        |
| 152-194             | 10-mer            | RVNTKVRSGF  | 173-182                | 93        | 131        |
| 152-194             | 10-mer            | VNTKVRSGFP  | 174-183                | 94        | 132        |
| 152-194             | 10-mer            | NTKVRSGGPL  | 175-184                | 95        | 133        |
| 152-194             | 10-mer            | TKVRSGGPLS  | 176-185                | 96        | 134        |
| 152-194             | 10-mer            | KVRSGGPLSK  | 177-186                | 97        | 135        |
| 152-194             | 10-mer            | VRSFGPLSKA  | 178-187                | 98        | 136        |
| 152-194             | 10-mer            | RSFGPLSKAG  | 179-188                | 99        | 137        |
| 152-194             | 10-mer            | SFGPLSKAGF  | 180-189                | 100       | 138        |
| 152-194             | 10-mer            | FGPLSKAGFY  | 181-190                | 101       | 139        |
| 152-194             | 10-mer            | GPLSKAGFYLA | 182-191                | 102       | 140        |
| 152-194             | 10-mer            | PLSKAGFYLA  | 183-192                | 103       | 141        |
| 152-194             | 10-mer            | LSKAGFYLA   | 184-193                | 104       | 142        |
| 152-194             | 10-mer            | SKAGFYLA    | 185-194                | 105       | 143        |
| 244-256             | 8-mer             | NAVEVSVPL   | 244-251                | 1         | 144        |
| 244-256             | 8-mer             | AVEVSVPL    | 245-252                | 2         | 145        |
| 244-256             | 8-mer             | VEVSVPLK    | 246-253                | 3         | 146        |
| 244-256             | 8-mer             | EVSVPLKL    | 247-254                | 4         | 147        |
| 244-256             | 8-mer             | VSVPLKLY    | 248-255                | 5         | 148        |
| 244-256             | 8-mer             | SVPLKLYC    | 249-256                | 6         | 149        |
| 244-256             | 9-mer             | NAVEVSVPL   | 244-252                | 7         | 150        |
| 244-256             | 9-mer             | AVEVSVPLK   | 245-253                | 8         | 151        |
| 244-256             | 9-mer             | VEVSVPLKL   | 246-254                | 9         | 152        |
| 244-256             | 9-mer             | EVSVPLKLY   | 247-255                | 10        | 153        |
| 244-256             | 9-mer             | VSVPLKLYC   | 248-256                | 11        | 154        |
| 244-256             | 10-mer            | NAVEVSVPLK  | 244-253                | 12        | 155        |
| 244-256             | 10-mer            | AVEVSVPLKL  | 245-254                | 13        | 156        |
| 244-256             | 10-mer            | VEVSVPLKLY  | 246-255                | 14        | 157        |
| 244-256             | 10-mer            | EVSVPLKLYC  | 247-256                | 15        | 158        |
| 274-298             | 8-mer             | GHEPAAKE    | 274-281                | 1         | 159        |
| 274-298             | 8-mer             | HEPAAKES    | 275-282                | 2         | 160        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo   | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|-----------|------------------------|-----------|------------|
| 274-298             | 8-mer             | EPAAKESQ  | 276-283                | 3         | 161        |
| 274-298             | 8-mer             | PAAKESQC  | 277-284                | 4         | 162        |
| 274-298             | 8-mer             | AAKESQCR  | 278-285                | 5         | 163        |
| 274-298             | 8-mer             | AKESQCRP  | 279-286                | 6         | 164        |
| 274-298             | 8-mer             | KESQCRPC  | 280-287                | 7         | 165        |
| 274-298             | 8-mer             | ESQCRPCP  | 281-288                | 8         | 166        |
| 274-298             | 8-mer             | SQCRPCPP  | 282-289                | 9         | 167        |
| 274-298             | 8-mer             | QCRPCPPG  | 283-290                | 10        | 168        |
| 274-298             | 8-mer             | CRPCPPGS  | 284-291                | 11        | 169        |
| 274-298             | 8-mer             | RPCPPGSY  | 285-292                | 12        | 170        |
| 274-298             | 8-mer             | PCPPGSYK  | 286-293                | 13        | 171        |
| 274-298             | 8-mer             | CPPGSYKA  | 287-294                | 14        | 172        |
| 274-298             | 8-mer             | PPGSYKAK  | 288-295                | 15        | 173        |
| 274-298             | 8-mer             | PGSYKAKQ  | 289-296                | 16        | 174        |
| 274-298             | 8-mer             | GSYKAKQG  | 290-297                | 17        | 175        |
| 274-298             | 8-mer             | SYKAKQGE  | 291-298                | 18        | 176        |
| 274-298             | 9-mer             | GHEPAAKES | 274-282                | 19        | 177        |
| 274-298             | 9-mer             | HEPAAKESQ | 275-283                | 20        | 178        |
| 274-298             | 9-mer             | EPAAKESQC | 276-284                | 21        | 179        |
| 274-298             | 9-mer             | PAAKESQCR | 277-285                | 22        | 180        |
| 274-298             | 9-mer             | AAKESQCRP | 278-286                | 23        | 181        |
| 274-298             | 9-mer             | AKESQCRPC | 279-287                | 24        | 182        |
| 274-298             | 9-mer             | KESQCRPCP | 280-288                | 25        | 183        |
| 274-298             | 9-mer             | ESQCRPCPP | 281-289                | 26        | 184        |
| 274-298             | 9-mer             | SQCRPCPPG | 282-290                | 27        | 185        |
| 274-298             | 9-mer             | QCRPCPPGS | 283-291                | 28        | 186        |
| 274-298             | 9-mer             | CRPCPPGSY | 284-292                | 29        | 187        |
| 274-298             | 9-mer             | RPCPPGSYK | 285-293                | 30        | 188        |
| 274-298             | 9-mer             | PCPPGSYKA | 286-294                | 31        | 189        |
| 274-298             | 9-mer             | CPPGSYKAK | 287-295                | 32        | 190        |
| 274-298             | 9-mer             | PPGSYKAKQ | 288-296                | 33        | 191        |
| 274-298             | 9-mer             | PGSYKAKQG | 289-297                | 34        | 192        |
| 274-298             | 9-mer             | GSYKAKQGE | 290-298                | 35        | 193        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo    | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 274-298             | 10-mer            | GHEPAAKESQ | 274-283                | 36        | 194        |
| 274-298             | 10-mer            | HEPAAKESQC | 275-284                | 37        | 195        |
| 274-298             | 10-mer            | EPAAKESQCR | 276-285                | 38        | 196        |
| 274-298             | 10-mer            | PAAKESQCRP | 277-286                | 39        | 197        |
| 274-298             | 10-mer            | AAKESQCRPC | 278-287                | 40        | 198        |
| 274-298             | 10-mer            | AKESQCRPCP | 279-288                | 41        | 199        |
| 274-298             | 10-mer            | KESQCRPCPP | 280-289                | 42        | 200        |
| 274-298             | 10-mer            | ESQCRPCPPG | 281-290                | 43        | 201        |
| 274-298             | 10-mer            | SQCRPCPPGS | 282-291                | 44        | 202        |
| 274-298             | 10-mer            | QCRPCPPGSY | 283-292                | 45        | 203        |
| 274-298             | 10-mer            | CRPCPPGSYK | 284-293                | 46        | 204        |
| 274-298             | 10-mer            | RPCPPGSYKA | 285-294                | 47        | 205        |
| 274-298             | 10-mer            | PCPPGSYKAK | 286-295                | 48        | 206        |
| 274-298             | 10-mer            | CPPGSYKAKQ | 287-296                | 49        | 207        |
| 274-298             | 10-mer            | PPGSYKAKQG | 288-297                | 50        | 208        |
| 274-298             | 10-mer            | PGSYKAKQGE | 289-298                | 51        | 209        |
| 313-336             | 8-mer             | PAASICTC   | 313-320                | 1         | 210        |
| 313-336             | 8-mer             | AASICTCH   | 314-321                | 2         | 211        |
| 313-336             | 8-mer             | ASICTCHN   | 315-322                | 3         | 212        |
| 313-336             | 8-mer             | SICTCHNN   | 316-323                | 4         | 213        |
| 313-336             | 8-mer             | ICTCHNNF   | 317-324                | 5         | 214        |
| 313-336             | 8-mer             | CTCHNNFY   | 318-325                | 6         | 215        |
| 313-336             | 8-mer             | TCHNNFYR   | 319-326                | 7         | 216        |
| 313-336             | 8-mer             | CHNNFYRA   | 320-327                | 8         | 217        |
| 313-336             | 8-mer             | HNNFYRAD   | 321-328                | 9         | 218        |
| 313-336             | 8-mer             | NNFYRADS   | 322-329                | 10        | 219        |
| 313-336             | 8-mer             | NFYRADSD   | 323-330                | 11        | 220        |
| 313-336             | 8-mer             | FYRADSDS   | 324-331                | 12        | 221        |
| 313-336             | 8-mer             | YRADSDSA   | 325-332                | 13        | 222        |
| 313-336             | 8-mer             | RADSDSAD   | 326-333                | 14        | 223        |
| 313-336             | 8-mer             | ADSDSADS   | 327-334                | 15        | 224        |
| 313-336             | 8-mer             | DSDSADSA   | 328-335                | 16        | 225        |
| 313-336             | 8-mer             | SDSADSAC   | 329-336                | 17        | 226        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítipo | epítipo    | Localização de seq. aa | Epítipo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 313-336             | 9-mer             | PAASICTCH  | 313-321                | 18        | 227        |
| 313-336             | 9-mer             | AASICTCHN  | 314-322                | 19        | 228        |
| 313-336             | 9-mer             | ASICTCHNN  | 315-323                | 20        | 229        |
| 313-336             | 9-mer             | SICTCHNNF  | 316-324                | 21        | 230        |
| 313-336             | 9-mer             | ICTCHNNFY  | 317-325                | 22        | 231        |
| 313-336             | 9-mer             | CTCHNNFYR  | 318-326                | 23        | 232        |
| 313-336             | 9-mer             | TCHNNFYRA  | 319-327                | 24        | 233        |
| 313-336             | 9-mer             | CHNNFYRAD  | 320-328                | 25        | 234        |
| 313-336             | 9-mer             | HNNFYRADS  | 321-329                | 26        | 235        |
| 313-336             | 9-mer             | NNFYRADSD  | 322-330                | 27        | 236        |
| 313-336             | 9-mer             | NFYRADSDS  | 323-331                | 28        | 237        |
| 313-336             | 9-mer             | FYRADSDSA  | 324-332                | 29        | 238        |
| 313-336             | 9-mer             | YRADSDSAD  | 325-333                | 30        | 239        |
| 313-336             | 9-mer             | RADSDSADS  | 326-334                | 31        | 240        |
| 313-336             | 9-mer             | ADSDSADSA  | 327-335                | 32        | 241        |
| 313-336             | 9-mer             | DSDSADSAC  | 328-336                | 33        | 242        |
| 313-336             | 10-mer            | PAASICTCHN | 313-322                | 34        | 243        |
| 313-336             | 10-mer            | AASICTCHNN | 314-323                | 35        | 244        |
| 313-336             | 10-mer            | ASICTCHNNF | 315-324                | 36        | 245        |
| 313-336             | 10-mer            | SICTCHNNFY | 316-325                | 37        | 246        |
| 313-336             | 10-mer            | ICTCHNNFYR | 317-326                | 38        | 247        |
| 313-336             | 10-mer            | CTCHNNFYRA | 318-327                | 39        | 248        |
| 313-336             | 10-mer            | TCHNNFYRAD | 319-328                | 40        | 249        |
| 313-336             | 10-mer            | CHNNFYRADS | 320-329                | 41        | 250        |
| 313-336             | 10-mer            | HNNFYRADSD | 321-330                | 42        | 251        |
| 313-336             | 10-mer            | NNFYRADSDS | 322-331                | 43        | 252        |
| 313-336             | 10-mer            | NFYRADSDSA | 323-332                | 44        | 253        |
| 313-336             | 10-mer            | FYRADSDSAD | 324-333                | 45        | 254        |
| 313-336             | 10-mer            | YRADSDSADS | 325-334                | 46        | 255        |
| 313-336             | 10-mer            | RADSDSADSA | 326-335                | 47        | 256        |
| 313-336             | 10-mer            | ADSDSADSAC | 327-336                | 48        | 257        |
| 362-383             | 8-mer             | PRDLGGRD   | 362-369                | 1         | 258        |
| 362-383             | 8-mer             | RDLGGRDD   | 363-370                | 2         | 259        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo    | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 362-383             | 8-mer             | DLGGRDDL   | 364-371                | 3         | 260        |
| 362-383             | 8-mer             | LGGRDDLL   | 365-372                | 4         | 261        |
| 362-383             | 8-mer             | GGRDDLLY   | 366-373                | 5         | 262        |
| 362-383             | 8-mer             | GRDDLLYN   | 367-374                | 6         | 263        |
| 362-383             | 8-mer             | RDDLLYNV   | 368-375                | 7         | 264        |
| 362-383             | 8-mer             | DDLLYNVI   | 369-376                | 8         | 265        |
| 362-383             | 8-mer             | DLLYNVIC   | 370-377                | 9         | 266        |
| 362-383             | 8-mer             | LLYNVICK   | 371-378                | 10        | 267        |
| 362-383             | 8-mer             | LYNVICKK   | 372-379                | 11        | 268        |
| 362-383             | 8-mer             | YNVICKKC   | 373-380                | 12        | 269        |
| 362-383             | 8-mer             | NVICKKCH   | 374-381                | 13        | 270        |
| 362-383             | 8-mer             | VICKKCHG   | 375-382                | 14        | 271        |
| 362-383             | 8-mer             | ICKKCHGA   | 376-383                | 15        | 272        |
| 362-383             | 9-mer             | PRDLGGRDD  | 362-370                | 16        | 273        |
| 362-383             | 9-mer             | RDLGGRDDL  | 363-371                | 17        | 274        |
| 362-383             | 9-mer             | DLGGRDDLL  | 364-372                | 18        | 275        |
| 362-383             | 9-mer             | LGGRDDLLY  | 365-373                | 19        | 276        |
| 362-383             | 9-mer             | GGRDDLLYN  | 366-374                | 20        | 277        |
| 362-383             | 9-mer             | GRDDLLYNV  | 367-375                | 21        | 278        |
| 362-383             | 9-mer             | RDDLLYNVI  | 368-376                | 22        | 279        |
| 362-383             | 9-mer             | DDLLYNVIC  | 369-377                | 23        | 280        |
| 362-383             | 9-mer             | DLLYNVICK  | 370-378                | 24        | 281        |
| 362-383             | 9-mer             | LLYNVICKK  | 371-379                | 25        | 282        |
| 362-383             | 9-mer             | LYNVICKKC  | 372-380                | 26        | 283        |
| 362-383             | 9-mer             | YNVICKKCH  | 373-381                | 27        | 284        |
| 362-383             | 9-mer             | NVICKKCHG  | 374-382                | 28        | 285        |
| 362-383             | 9-mer             | VICKKCHGA  | 375-383                | 29        | 286        |
| 362-383             | 10-mer            | PRDLGGRDDL | 362-371                | 30        | 287        |
| 362-383             | 10-mer            | RDLGGRDDLL | 363-372                | 31        | 288        |
| 362-383             | 10-mer            | DLGGRDDLLY | 364-373                | 32        | 289        |
| 362-383             | 10-mer            | LGGRDDLLYN | 365-374                | 33        | 290        |
| 362-383             | 10-mer            | GGRDDLLYNV | 366-375                | 34        | 291        |
| 362-383             | 10-mer            | GRDDLLYNVI | 367-376                | 35        | 292        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo    | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 362-383             | 10-mer            | RDDLLYNVIC | 368-377                | 36        | 293        |
| 362-383             | 10-mer            | DDLLYNVICK | 369-378                | 37        | 294        |
| 362-383             | 10-mer            | DLLYNVICKK | 370-379                | 38        | 295        |
| 362-383             | 10-mer            | LLYNVICKKC | 371-380                | 39        | 296        |
| 362-383             | 10-mer            | LYNVICKKCH | 372-381                | 40        | 297        |
| 362-383             | 10-mer            | YNVICKKCHG | 373-382                | 41        | 298        |
| 362-383             | 10-mer            | NVICKKCHGA | 374-383                | 42        | 299        |
| 436-469             | 8-mer             | PLPPRYAA   | 436-443                | 1         | 300        |
| 436-469             | 8-mer             | LPPRYAAV   | 437-444                | 2         | 301        |
| 436-469             | 8-mer             | PPRYAAVN   | 438-445                | 3         | 302        |
| 436-469             | 8-mer             | PRYAAVNI   | 439-446                | 4         | 303        |
| 436-469             | 8-mer             | RYAAVNIT   | 440-447                | 5         | 304        |
| 436-469             | 8-mer             | YAAVNITT   | 441-448                | 6         | 305        |
| 436-469             | 8-mer             | AAVNITTN   | 442-449                | 7         | 306        |
| 436-469             | 8-mer             | AVNITTNQ   | 443-450                | 8         | 307        |
| 436-469             | 8-mer             | VNITTNQA   | 444-451                | 9         | 308        |
| 436-469             | 8-mer             | NITTNQAA   | 445-452                | 10        | 309        |
| 436-469             | 8-mer             | ITTNQAAP   | 446-453                | 11        | 310        |
| 436-469             | 8-mer             | TTNQAAP    | 447-454                | 12        | 311        |
| 436-469             | 8-mer             | TNQAAPSE   | 448-455                | 13        | 312        |
| 436-469             | 8-mer             | NQAAPSEV   | 449-456                | 14        | 313        |
| 436-469             | 8-mer             | QAAPSEVP   | 450-457                | 15        | 314        |
| 436-469             | 8-mer             | AAPSEVPT   | 451-458                | 16        | 315        |
| 436-469             | 8-mer             | APSEVPTL   | 452-459                | 17        | 316        |
| 436-469             | 8-mer             | PSEVPTLR   | 453-460                | 18        | 317        |
| 436-469             | 8-mer             | SEVPTLRL   | 454-461                | 19        | 318        |
| 436-469             | 8-mer             | EVPTLRLH   | 455-462                | 20        | 319        |
| 436-469             | 8-mer             | VPTLRLHS   | 456-463                | 21        | 320        |
| 436-469             | 8-mer             | PTLRLHSS   | 457-464                | 22        | 321        |
| 436-469             | 8-mer             | TLRLHSSS   | 458-465                | 23        | 322        |
| 436-469             | 8-mer             | LRLHSSSG   | 459-466                | 24        | 323        |
| 436-469             | 8-mer             | RLHSSSGS   | 460-467                | 25        | 324        |
| 436-469             | 8-mer             | LHSSSGSS   | 461-468                | 26        | 325        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo    | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 436-469             | 8-mer             | HSSSGSSL   | 462-469                | 27        | 326        |
| 436-469             | 9-mer             | PLPPRYAAV  | 436-444                | 28        | 327        |
| 436-469             | 9-mer             | LPPRYAAVN  | 437-445                | 29        | 328        |
| 436-469             | 9-mer             | PPRYAAVNI  | 438-446                | 30        | 329        |
| 436-469             | 9-mer             | PRYAAVNIT  | 439-447                | 31        | 330        |
| 436-469             | 9-mer             | RYAAVNITT  | 440-448                | 32        | 331        |
| 436-469             | 9-mer             | YAAVNITTN  | 441-449                | 33        | 332        |
| 436-469             | 9-mer             | AAVNITTNQ  | 442-450                | 34        | 333        |
| 436-469             | 9-mer             | AVNITTNQA  | 443-451                | 35        | 334        |
| 436-469             | 9-mer             | VNITTNQAA  | 444-452                | 36        | 335        |
| 436-469             | 9-mer             | NITTNQAAP  | 445-453                | 37        | 336        |
| 436-469             | 9-mer             | ITTNQAPS   | 446-454                | 38        | 337        |
| 436-469             | 9-mer             | TTNQAAPSE  | 447-455                | 39        | 338        |
| 436-469             | 9-mer             | TNQAAPSEV  | 448-456                | 40        | 339        |
| 436-469             | 9-mer             | NQAAPSEVP  | 449-457                | 41        | 340        |
| 436-469             | 9-mer             | QAAPSEVPT  | 450-458                | 42        | 341        |
| 436-469             | 9-mer             | AAPSEVPTL  | 451-459                | 43        | 342        |
| 436-469             | 9-mer             | APSEVPTLR  | 452-460                | 44        | 343        |
| 436-469             | 9-mer             | PSEVPTLRL  | 453-461                | 45        | 344        |
| 436-469             | 9-mer             | SEVPTLRLH  | 454-462                | 46        | 345        |
| 436-469             | 9-mer             | EVPTLRLHS  | 455-463                | 47        | 346        |
| 436-469             | 9-mer             | VPTLRLHSS  | 456-464                | 48        | 347        |
| 436-469             | 9-mer             | PTLRLHSSS  | 457-465                | 49        | 348        |
| 436-469             | 9-mer             | TLRLHSSSG  | 458-466                | 50        | 349        |
| 436-469             | 9-mer             | LRLHSSSGS  | 459-467                | 51        | 350        |
| 436-469             | 9-mer             | RLHSSSGSS  | 460-468                | 52        | 351        |
| 436-469             | 9-mer             | LHSSSGSSL  | 461-469                | 53        | 352        |
| 436-469             | 10-mer            | PLPPRYAAVN | 436-445                | 54        | 353        |
| 436-469             | 10-mer            | LPPRYAAVNI | 437-446                | 55        | 354        |
| 436-469             | 10-mer            | PPRYAAVNIT | 438-447                | 56        | 355        |
| 436-469             | 10-mer            | PRYAAVNITT | 439-448                | 57        | 356        |
| 436-469             | 10-mer            | RYAAVNITTN | 440-449                | 58        | 357        |
| 436-469             | 10-mer            | YAAVNITTNQ | 441-450                | 59        | 358        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo     | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|-------------|------------------------|-----------|------------|
| 436-469             | 10-mer            | AAVNITTNQA  | 442-451                | 60        | 359        |
| 436-469             | 10-mer            | AVNITTNQAA  | 443-452                | 61        | 360        |
| 436-469             | 10-mer            | VNITTNQAAP  | 444-453                | 62        | 361        |
| 436-469             | 10-mer            | NITTNQAAPS  | 445-454                | 63        | 362        |
| 436-469             | 10-mer            | ITTNQAAPSE  | 446-455                | 64        | 363        |
| 436-469             | 10-mer            | TTNQAAPSEV  | 447-456                | 65        | 364        |
| 436-469             | 10-mer            | TNQAAPSEVP  | 448-457                | 66        | 365        |
| 436-469             | 10-mer            | NQAAPSEVPT  | 449-458                | 67        | 366        |
| 436-469             | 10-mer            | QAAPSEVPTL  | 450-459                | 68        | 367        |
| 436-469             | 10-mer            | AAPSEVPTLR  | 451-460                | 69        | 368        |
| 436-469             | 10-mer            | APSEVPTLRL  | 452-461                | 70        | 369        |
| 436-469             | 10-mer            | PSEVPTLRLH  | 453-462                | 71        | 370        |
| 436-469             | 10-mer            | SEVPTLRLHS  | 454-463                | 72        | 371        |
| 436-469             | 10-mer            | EVPTLRLHSS  | 455-464                | 73        | 372        |
| 436-469             | 10-mer            | VPTRLRLHSSS | 456-465                | 74        | 373        |
| 436-469             | 10-mer            | PTLRLHSSSG  | 457-466                | 75        | 374        |
| 436-469             | 10-mer            | TLRLHSSSGS  | 458-467                | 76        | 375        |
| 436-469             | 10-mer            | LRLHSSSGSS  | 459-468                | 77        | 376        |
| 436-469             | 10-mer            | RLHSSSGSSL  | 460-469                | 78        | 377        |
| 509-530             | 8-mer             | QLDGLRPD    | 509-516                | 1         | 378        |
| 509-530             | 8-mer             | LDGLRPDA    | 510-517                | 2         | 379        |
| 509-530             | 8-mer             | DGLRPDAR    | 511-518                | 3         | 380        |
| 509-530             | 8-mer             | GLRPDARY    | 512-519                | 4         | 381        |
| 509-530             | 8-mer             | LRPDARYV    | 513-520                | 5         | 382        |
| 509-530             | 8-mer             | RPDARYVV    | 514-521                | 6         | 383        |
| 509-530             | 8-mer             | PDARYVVQ    | 515-522                | 7         | 384        |
| 509-530             | 8-mer             | DARYVVQV    | 516-523                | 8         | 385        |
| 509-530             | 8-mer             | ARYVVQVR    | 517-524                | 9         | 386        |
| 509-530             | 8-mer             | RYVVQVRA    | 518-525                | 10        | 387        |
| 509-530             | 8-mer             | YVVQVRAR    | 519-526                | 11        | 388        |
| 509-530             | 8-mer             | VVQVRART    | 520-527                | 12        | 389        |
| 509-530             | 8-mer             | VQVRARTV    | 521-528                | 13        | 390        |
| 509-530             | 8-mer             | QVRARTVA    | 522-529                | 14        | 391        |

| Região Mapeada (aa) | Compr. do epítopo | epítopo    | Localização de seq. aa | Epítopo # | SEQ ID NO: |
|---------------------|-------------------|------------|------------------------|-----------|------------|
| 509-530             | 8-mer             | VRARTVAG   | 523-530                | 15        | 392        |
| 509-530             | 9-mer             | QLDGLRPDA  | 509-517                | 16        | 393        |
| 509-530             | 9-mer             | LDGLRPDAR  | 510-518                | 17        | 394        |
| 509-530             | 9-mer             | DGLRPDARY  | 511-519                | 18        | 395        |
| 509-530             | 9-mer             | GLRPDARYV  | 512-520                | 19        | 396        |
| 509-530             | 9-mer             | LRPDARYVV  | 513-521                | 20        | 397        |
| 509-530             | 9-mer             | RPDARYVVQ  | 514-522                | 21        | 398        |
| 509-530             | 9-mer             | PDARYVVQV  | 515-523                | 22        | 399        |
| 509-530             | 9-mer             | DARYVVQVR  | 516-524                | 23        | 400        |
| 509-530             | 9-mer             | ARYVVQVRA  | 517-525                | 24        | 401        |
| 509-530             | 9-mer             | RYVVQVRAR  | 518-526                | 25        | 402        |
| 509-530             | 9-mer             | YVVQVRART  | 519-527                | 26        | 403        |
| 509-530             | 9-mer             | VVQVRARTV  | 520-528                | 27        | 404        |
| 509-530             | 9-mer             | VQVRARTVA  | 521-529                | 28        | 405        |
| 509-530             | 9-mer             | QVRARTVAG  | 522-530                | 29        | 406        |
| 509-530             | 10-mer            | QLDGLRPDAR | 509-518                | 30        | 407        |
| 509-530             | 10-mer            | LDGLRPDARY | 510-519                | 31        | 408        |
| 509-530             | 10-mer            | DGLRPDARYV | 511-520                | 32        | 409        |
| 509-530             | 10-mer            | GLRPDARYVV | 512-521                | 33        | 410        |
| 509-530             | 10-mer            | LRPDARYVVQ | 513-522                | 34        | 411        |
| 509-530             | 10-mer            | RPDARYVVQV | 514-523                | 35        | 412        |
| 509-530             | 10-mer            | PDARYVVQVR | 515-524                | 36        | 413        |
| 509-530             | 10-mer            | DARYVVQVRA | 516-525                | 37        | 414        |
| 509-530             | 10-mer            | ARYVVQVRAR | 517-526                | 38        | 415        |
| 509-530             | 10-mer            | RYVVQVRART | 518-527                | 39        | 416        |
| 509-530             | 10-mer            | YVVQVRARTV | 519-528                | 40        | 417        |
| 509-530             | 10-mer            | VVQVRARTVA | 520-529                | 41        | 418        |
| 509-530             | 10-mer            | VQVRARTVAG | 521-530                | 42        | 419        |

### Polyclonal Antibodies

Anticorpos policlonais são preferivelmente construídos em animais por injeções múltiplas subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Uma resposta de anticorpo melhorada pode

ser obtida conjugando-se o antígeno relevante a uma proteína que é imunogênica nas espécies a ser imunizadas, por exemplo, hemocianina de lapa de buraco de fechadura, albumina de soro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja usando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de sulfossucinimida de maleimidobenzoíla (conjugação por meio de resíduos de cisteína), N-hidroxissucinimida (por meio de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico ou outros agentes conhecidos na técnica.

Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados combinando-se, por exemplo, 100 µg ou 5 µg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução intradermicamente em múltiplos sítios. Um mês depois, os animais são reforçados com 1/5 a {fração (1/10)} a quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Nos dias 7-14 após a injeção de reforço, os animais são sangrados e o soro é ensaiado quanto ao título de anticorpo. Os animais são reforçados até o platô de título. Preferivelmente, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antígeno, porém conjugado a uma proteína diferente e/ou por meio de um diferente reagente de reticulação. Os conjugados também podem ser feitos em cultura celular recombinante como fusões de proteína. Além disso, agentes de agregação tal como alume são adequadamente usados para realçar a resposta imune.

#### Anticorpos Monoclonais

Anticorpos Monoclonais podem ser feitos usando o método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e outro, Nature, 256:495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante.

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um *hamster* ou macaco de face vermelha, é imunizado como aqui descrito para eliciar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que especificamente se ligarão à proteína usada para a imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados

*in vitro*. Os linfócitos então são fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles e Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

- 5                   As células de hibridoma desse modo preparadas são semeadas e desenvolvidas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parenterais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parenterais não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirão hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), cujas substâncias previnem o crescimento de células deficientes de HGPRT.
- 10

- As células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a produção de nível elevado estável de anticorpo pelas células de produção de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio. Linhagens de célula de mieloma humano e heteromieloma humanas – de camundongo também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur e outro, *Monoclonal Antibody Production Techniques e Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)). Linhagens de mieloma de murino exemplares incluem aquelas derivadas de tumores de camundongo MOP-21 e M.C.-11 disponibilizadas pelo Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, e as células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponibilizadas pela American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA.
- 15
- 20

- 25                   O meio de cultura em que as células de hibridoma estão se desenvolvendo é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tais como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado por enzima (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada por análise Scatchard (Munson e outro, *Anal. Biochem.*, 107:220
- 30

(1980)).

Após as células de hibridoma serem identificadas que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados limitando os procedimentos de diluição e desenvol-

5 vidos por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles e Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser desenvolvidas *in vivo* como tumores de ascite em um animal. Os anticorpos monoclonais secretados

10 pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

DNA codificando os anticorpos monoclonais podem ser isolados

15 e sequenciados das células de hibridoma usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leve dos anticorpos monoclonais). A determinação de sequência e modo geral requerirá o isolamento de pelo menos uma porção do gene ou cDNA de interesse.

20 Geralmente isto requer a clonagem do DNA ou, preferivelmente, mRNA (isto é, cDNA) codificando os anticorpos monoclonais. A clonagem é realizada usando técnicas padrões (veja, por exemplo, Sambrook e outro, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, que é incorporado aqui por referência). Por exemplo, uma biblioteca de cDNA

25 pode ser construída por transcrição reversa de poliA+ mRNA, preferivelmente mRNA associado com membrana, e a biblioteca analisada usando sondas específicas para sequências de gene de polipeptídeo de imunoglobulina humanas. Em uma modalidade preferida, entretanto, a reação de cadeia de polimerase (PCR) é usada para amplificar cDNAs (ou porções de cDNAs de

30 tamanho natural) codificando um segmento de gene de imunoglobulina de interesse (por exemplo, o segmento variável de cadeia leve). As sequências amplificadas podem ser facilmente clonadas em qualquer vetor adequado,

por exemplo, vetores de expressão, vetores de minigene, ou vetores de exibição de fago. Será apreciado que o método particular de clonagem usando não crítico, contanto que seja possível determinar a sequência de alguma porção do polipeptídeo de imunoglobulina de interesse. Como aqui usado, uma molécula de ácido nucléico "isolada" ou sequência de ácido nucléico "isolada" é uma molécula de ácido nucléico que é ou (1) identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucléico contaminante com a qual está ordinariamente associada na fonte natural do ácido nucléico ou (2) clonada, amplificada, rotulada, ou de outro modo distinguida dos ácidos nucléicos de base de tal que a sequência do ácido nucléico de interesse que pode ser determinada, seja considerada isolada. Uma molécula de ácido nucléico isolada é exceto na forma ou fixação em que ele é encontrada em natura. As moléculas de ácido nucléico isoladas, portanto, são distinguidas da molécula de ácido nucléico como ela existe em células naturais. Entretanto, uma molécula de ácido nucléico isolada inclui uma molécula de ácido nucléico contida em células que ordinariamente expressam o anticorpo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucléico está em uma localização cromossômica diferente daquela de células naturais.

Uma fonte para RNA usada para clonagem e sequenciamento é um hibridoma produzido obtendo-se uma célula B do camundongo transgênico e fundindo a célula B a uma célula imortal. Uma vantagem de usar os hibridomas é que eles podem ser facilmente analisados, e um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal humano de interesse selecionado. Alternativamente, o RNA pode ser isolado de células B (ou baço total) do animal imunizado. Quando fontes exceto hibridomas são usadas, pode ser desejável analisar quanto às sequências codificando imunoglobulinas ou polipeptídeos de imunoglobulina com características de ligação específicas. Um método para tal análise é o uso de tecnologia de exibição de fago. A exibição de fago é descrita, por exemplo, em Dower e outro, WO 91/17271, McCafferty e outro, WO 92/01047, e Caton e Koprowski, *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6450-6454 (1990), cada dos quais é incorporado aqui por referência. Em uma modalidade usando a tecnologia de exibição de fago, o cDNA de

um camundongo transgênico imunizado (por exemplo, cDNA de baço total) é isolado, a reação de cadeia de polimerase é usada para amplificar as sequências de cDNA que codificam uma porção de um polipeptídeo de imunoglobulina, por exemplo, regiões CDR, e as sequências amplificadas são inseridas em um vetor de fago. Os cDNAs codificando peptídeos de interesse, por exemplo, peptídeos de região variável com características de ligação desejadas, são identificadas por técnicas padrão tal como panículação.

A sequência do ácido nucléico amplificado ou clonado é então determinada. Tipicamente a sequência codificando uma região variável inteira do polipeptídeo de imunoglobulina é determinada, entretanto, algumas vezes por adequação à sequência será apenas uma porção de uma região variável, por exemplo, a porção codificando a CDR. Tipicamente a porção sequenciada será de pelo menos 30 bases de comprimento, mais frequentemente com base na codificação para pelo menos cerca de um terço ou pelo menos cerca de metade do comprimento da região variável será sequenciada.

O sequenciamento pode ser realizado em clones isolados de uma biblioteca de cDNA, ou, quando a PCR é usada, após clonagem da sequência amplificada ou por sequenciamento de PCR direto do segmento amplificado. O sequenciamento é realizado usando técnicas padrão (veja, por exemplo, Sambrook e outro (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, e Sanger, F. e outro (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, que é aqui incorporado por referência). Comparando-se a sequência do ácido nucléico clonado com as sequências publicadas de genes de imunoglobulina humana e cDNAs, alguém versado facilmente será capaz de determinar, dependendo da região sequenciada, (i) o uso de segmento de linha germinativa do polipeptídeo de imunoglobulina de hibridoma (incluindo o isótipo da cadeia pesada) e (ii) a sequência de regiões variáveis de cadeia pesada e leve, incluindo sequências que resultam de adição de região N e o processo de mutação somática. Uma fonte de informação de sequência de gene de imunoglobulina é o National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of

Health, Bethesda, Md.

### Fragmentos de Anticorpo

Como observado acima, fragmentos de anticorpo compreendem uma porção de um anticorpo de tamanho natural intacto, preferivelmente uma região variável ou de ligação de antígeno do anticorpo intacto, e incluem anticorpos lineares e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. Exemplos não limitantes de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, anticorpo de domínio (dAb), fragmentos de região de determinação de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única (scFv), fragmentos de anticorpo de cadeia única, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, anticorpos lineares, anticorpos recombinantes quelantes, tricorpos ou bicorpos, intracorpos, nanocorpos, imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs), uma proteína de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação de antígeno, um anticorpo camelizado, um anticorpo contendo VHH, ou muteínas ou derivados dos mesmos, e polipeptídeos que contêm pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação de antígeno específico ao polipeptídeo, tal como uma sequência de CDR, contanto que o anticorpo retenha a atividade biológica desejada. Tais fragmentos de antígeno podem ser produzidos pela modificação de anticorpos totais ou sintetizados *de novo* usando tecnologias de DNA recombinante ou síntese de peptídeo.

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpo pequeno com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH VL). Usando um ligador que é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Diacorpos são descritos mais totalmente em, por exemplo, EP 404,097; WO 93/11161; e 30 Hollinger e outro, *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" com-

preendem os domínios  $V_H$  e  $V_L$  de anticorpo, onde estes domínios estão presentes em uma cadeia de polipeptídeo única, e opcionalmente compreendendo um ligador de polipeptídeo entre os domínios  $V_H$  e  $V_L$  que possibilitam a Fv formar a estrutura desejada para ligação de antígeno (Bird e outro, *Science* 242:423-426, 1988, e Huston e outro, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988). Um fragmento de Fd consiste nos domínios  $V_H$  e  $C_H1$ .

Fragmento de anticorpo adicional inclui um fragmento de anticorpo de domínio (dAb) (Ward e outro, *Nature* 341:544-546, 1989) que consiste em um domínio  $V_H$ .

"Anticorpos lineares" compreendem um par de segmentos Fd tandem ( $V_H$ - $C_H1$ - $V_H$ - $C_H1$ ) que forma um par de regiões de ligação de antígeno. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos (Zapata e outro *Protein Eng.* 8:1057-62 (1995)).

Um "minicorpo" consistindo em scFv fundida a CH3 por meio de um ligador de peptídeo (sem articulação) ou por meio de uma articulação de IgG foi descrito em Olafsen, e outro, *protein Eng Des Sel.* 2004 Apr;17(4):315-23.

Anticorpos de cadeia pesada funcionais destituídos de cadeias leves são de ocorrência natural em tubarões enfermeira (Greenberg e outro, *Nature* 374:168-73, 1995), tubarões wobbegong (Nuttall e outro, *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001) e *Camelidae* (Hamers-Casterman e outro, *Nature* 363:446-8, 1993; Nguyen e outro, *J. Mol. Biol.* 275: 413, 1998), tais como camelos, dromedários, alpacas e llamas. O sítio de ligação de antígeno é reduzido para um domínio único, o domínio  $V_{HH}$ , nestes animais. Estes anticorpos formam regiões de ligação de antígeno usando apenas região variável de cadeia pesada, isto é, estes anticorpos funcionais são homodímeros de cadeias pesadas apenas tendo a estrutura  $H_2L_2$  (referidos como "anticorpos de cadeia pesada" ou "HCAbs").  $V_{HH}$  camelizado reportadamente recombina-se com as regiões constantes IgG2 e IgG3 que contêm articulação, domínios CH2, e CH3 e não têm um domínio CH1 (Hamers-Casterman e outro, *supra*). Por exemplo, IgG1 de llama é um isótipo de anticorpo convencional ( $H_2L_2$ ) em que  $V_H$  recombina-se com uma região constante que contém arti-

culação, domínios CH1, CH2 e CH3, ao passo que IgG2 e IgG3 de llama são isótipos apenas de cadeia pesada que não têm domínios de CH1 e que não contêm nenhuma cadeia leve. Fragmentos apenas de V<sub>H</sub> clássicos são difíceis de produzir em forma solúvel, porém melhoras em solubilidade e ligação específica podem ser obtidas quando resíduos de estrutura são alterados para ficarem mais semelhantes a V<sub>H</sub>H. (Veja, por exemplo, Reichman, e outro, *J Immunol métodos* 1999, 231:25-38.) Domínios de V<sub>HH</sub> camelizados foram descobertos ligarem-se a antígeno com alta afinidade (Desmyter e outro, *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001) e possuem alta estabilidade em solução (Ewert e outro, *Biochemistry* 41:3628-36, 2002). Métodos para gerar anticorpos tendo cadeias pesadas camelizadas são descritos, por exemplo, na Publicação de Patente dos Estados Unidos nºs 20050136049 e 20050037421.

Por que o domínio variável dos anticorpos de cadeia pesada é o menor fragmento de ligação de antígeno totalmente funcional com uma massa molecular de apenas 15 kDa, esta entidade é referida como um nanocorpo (Cortez-Retamozo e outro, *Cancer Research* 64:2853-57, 2004). Uma biblioteca de nanocorpo pode ser gerada de um dromedário imunizado como descrito em Conrath e outro, (*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001) ou usando métodos recombinantes como descrito em

Intracorpos são anticorpos de cadeia única que demonstram expressão intracelular e podem manipular a função de proteína intracelular (Biocca, e outro, *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby e outro, *proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17616-21, 2004). Intracorpos, que compreendem sequências sinal celulares que retêm a construção de anticorpo em regiões intracelulares, podem ser produzidas como descrito em Mhashilkar e outro (*EMBO J* 14:1542-51, 1995) e Wheeler e outro (*FASEB J.* 17:1733-5. 2003). Transcorpos são anticorpos permeáveis à célula em que um domínio de transdução de proteína (PTD) é fundido com anticorpos de fragmento variável de cadeia única (scFv) Heng e outro, (*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005).

São também contemplados anticorpos que são SMIPs ou proteí-

nas de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação específicas para proteína alvo. Estas construções são polipeptídeos de cadeia única compreendendo domínios de ligação de antígeno fundidos aos domínios de imunoglobulina necessários para realizar funções efectoras de anticorpo. Veja por exemplo, WO 03/041600, Publicação de Patente dos Estados Unidos nº 20030133939 e Publicação de Patente dos Estados Unidos nº 20030118592.

#### Anticorpos Multivalentes

Em algumas modalidades, pode ser desejável gerar anticorpo monoclonal multivalente ou mesmo um multiespecífico (por exemplo, biespecífico, triespecífico, etc.). Tal anticorpo pode ter especificidades de ligação para pelo menos dois diferentes epítomos do antígeno alvo, ou alternativamente ele pode ligar-se a duas diferentes moléculas, por exemplo, ao antígeno alvo e à proteína ou receptor de superfície celular. Por exemplo, um anticorpo biespecífico pode incluir uma ramificação que se liga ao alvo e outra ramificação que se liga a uma molécula gatilho sobre um leucócito tal como uma molécula receptora de célula T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou receptores de Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) a fim de focar os mecanismos de defesa celular para a célula expressando o alvo. Como outro exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser usados para localizar agentes citotóxicos para as células que expressam o antígeno alvo. Estes anticorpos possuem uma ramificação de ligação ao alvo e uma ramificação que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferon-60, alcalóide vinca, cadeia de ricina A, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Anticorpos multiespecíficos podem ser preparados como anticorpos de tamanho natural ou fragmentos de anticorpo.

Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina, o outro à biotina. Anticorpos heteroconjugados podem ser feitos usando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes de reticulação adequada são bem conhecidos na técnica, e são descritos na Patente dos Estados Unidos nº 4.676.980, juntamente com várias

técnicas de reticulação.

De acordo com outro método para preparar anticorpos biespecíficos, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser construída para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados de cultura de célula recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio  $C_H3$  de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácido pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) laterais grandes são criadas sobre a interface da segunda molécula de anticorpo substituindo cadeias laterais de aminoácido grandes com outras menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isto fornece um mecanismo para aumentar a produção do heterodímero sobre outros produtos acabados indesejados tais como homodímeros. Veja o WO 96/27011 publicado em 6 de setembro de 1996.

Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos de fragmentos de anticorpo têm sido também descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando usando ligação química. Brennan e outro, Science 229:81 (1985) descrevem um procedimento onde anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação de ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos de  $Fab'$  gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de  $Fab'$ -TNB é então novamente convertido no  $Fab'$ -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de  $Fab'$ -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas. Better e outro, Science 240: 1041-1043 (1988) descrevem a secreção de fragmentos de anticorpo funcional de bactérias (veja, por exemplo, Better e outro, Skerra e outro Science 240: 1038-1041 (1988)). Por exemplo, fragmentos  $Fab'$ -SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli*

e quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos (Carter e outro, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992); Shalaby e outro, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992)).

Shalaby e outro, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) descrevem a  
 5 produção de uma molécula de  $F(ab')_2$  de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' foi separadamente secretado de *E.coli* e submetido a acoplamento químico direto *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico desse modo formado foi capaz de se  
 10 ligar às células superexpressando o receptor HER2 e células T humanas normais, bem como disparar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano.

Várias técnicas para preparar e isolar fragmentos de anticorpo biespecífico diretamente de cultura de célula recombinante têm sido também descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos têm sido produzidos usando  
 15 fechos de leucina, por exemplo, GCN4. (Veja geralmente Kostelny e outro, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992).) Os peptídeos de fecho de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois diferentes anticorpos por fusão de gene. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e em seguidas novamente  
 20 oxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo.

O termo "dicorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo (VH VL). Usando  
 25 um ligador que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Veja, por exemplo, Hollinger e outro, *proc. Natl. Acad. Sci. USA*,  
 30 90:6444-6448 (1993).

Outra estratégia para preparar fragmentos de anticorpo biespecíficos pelo uso de dímeros de Fv (sFv) de cadeia única foram também repor-

tados. Veja Gruber e outro, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994).

Alternativamente, o anticorpo biespecífico pode ser um "anticorpo linear" produzido como descrito em Zapata e outro *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Em síntese, estes anticorpos compreendem um par de segmentos Fd tandem ( $V_H$ - $C_H1$ - $V_H$ - $C_H1$ ) que formam um par de regiões de ligação de antígeno. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

Anticorpos com mais do que duas valências são também contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. (Tutt e outro, *J. Immunol.* 147:60 (1991)).

Um "anticorpo recombinante quelante" é um anticorpo biespecífico que reconhece epítomos adjacentes e não sobrepostos do antígeno alvo, e é flexível o suficiente para ligar-se a ambos os epítomos simultaneamente (Neri e outro, *J Mol Biol.* 246:367-73, 1995).

Produção de Fab-scFv biespecífico ("bicorpo") e Fab-(scFv)(2) triespecífico ("tricorpo") são descritos em Schoonjans e outro (*J Immunol.* 165:7050-57, 2000) e Willems e outro (*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003). Para bicorpos ou tricorpos, uma molécula scFv é fundida a uma ou ambas as cadeias VL-CL (L) e VH-CH<sub>1</sub> (Fd), por exemplo, para produzir um tricorpo duas scFvs são fundidas à terminação C de Fab, enquanto que em um bicorpo uma scFv é fundida à terminação C de Fab.

#### Produção Recombinante de Anticorpos

Anticorpos podem ser produzidos por metodologia de DNAS recombinante usando um dos sistemas de expressão de anticorpo bem conhecidos na técnica (Veja, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

Anticorpos codificando DNA da invenção podem ser substituídos em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS síbias, células 293 de rim embrionário humanas (por exemplo, células 293E), células de ovário *hamster* chinês (CHO), ou células de mieloma que de outra maneira não produzem

proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A produção de anticorpos recombinantes é bem conhecida na técnica. Fragmentos de anticorpo foram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja, por exemplo, Morimoto e outro, *Journal of Biochemical e Biophysical métodos* 24:107-117 (1992) e Brennan e outro, *Science* 229:81 (1985)). Entretanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo, incluindo síntese de peptídeo e ligação covalente, serão evidentes para o prático experiente.

Sequências de controle de expressão referem-se à sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operavelmente ligada em um organismo hospedeiro particular. As sequências de controle que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um sítio de ligação de ribossoma. Células eucarióticas são conhecidas utilizarem promotores, sinais de poliadenilação, e realçadores.

Ácido nucléico é operavelmente ligado quando ele é colocado em uma ligação funcional com outra sequência de ácido nucléico. Por exemplo, DNA para a sequência ou líder secretora é operavelmente ligada ao DNA para um polipeptídeo se ela for expressa como uma preproteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou realçador é operavelmente ligado a uma sequência de codificação se ela afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossoma é operavelmente ligado a uma sequência de codificação se ela for posicionada de modo a facilitar a translação. Geralmente, operavelmente ligada significa que as sequências de DNA que estão sendo ligadas são contínuas, e, no caso de uma líder secretora, contígua e em fase de leitura. Entretanto, realçadores não devem ser contíguos. A ligação é realizada por ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, os adaptadores ou ligadores de oligonucleotídeo sintético são usados de acordo com prática convencional.

Célula, linhagem celular, e cultura celular são frequentemente

usadas alternadamente e todass as tais designações aqui incluem progênie. Transformantes e células transformadas incluem a célula e culturas objeto primárias derivadas dos mesmos sem considerar o número de transferências. Entende-se também que toda progênie pode não ser precisamente idêntica em conteúdo de DNA, devido à mutações deliberadas ou negligentes. Progênie mutante que tem a mesma função ou atividade biológica como analisadas na célula originalmente transformada são incluídas. Onde designações distintas são pretendidas, será claro a partir do contexto.

Em uma modalidade alternativa, a sequência de aminoácido de uma imunoglobulina de interesse pode ser determinada por sequenciamento de proteína direto. Sequências de nucleotídeo de codificação adequadas podem ser designadas de acordo com uma tabela de códon universal.

Muteínas de sequência de aminoácido do anticorpo desejado podem ser preparadas introduzindo-se mudanças de nucleotídeo apropriadas no DNA de codificação, ou por síntese de peptídeo. Tais muteínas incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos dentro das sequências de aminoácido dos anticorpos. Qualquer combinação de deleção, inserção, e substituição é feita para chegar à construção final, contanto que a construção possua as características desejadas. As mudanças de aminoácido também podem alterar processos pos-translacionais do anticorpo monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered<sup>TM</sup> ou de muteína, tais como mudando o número ou a posição de sítios de glicosilação.

Moléculas de ácido nucléico codificando muteínas de sequência de aminoácido do anticorpo são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, porém não estão limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de muteínas de sequência de aminoácido de ocorrência natural) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou direcionada ao sítio), mutagênese de pCR, e mutagênese de cassete de uma muteína anteriormente preparadas ou uma versão de não-muteína do anticorpo.

A invenção também fornece ácido nucléico isolado codificando

anticorpos da invenção, opcionalmente operavelmente ligados à sequências de controle reconhecidas por uma célula hospedeira, vetores e células hospedeiras compreendendo os ácidos nucleicos, e técnicas recombinantes para a produção dos anticorpos, que podem compreender cultivar a célula hospedeira de modo que o ácido nucleico seja expresso e, opcionalmente, recuperar o anticorpo da cultura de célula hospedeira ou meio de cultura.

Para a produção recombinante do anticorpo, a codificação do ácido nucleico é isolada e inseridas em um vetor replicável para outra clonagem (amplificação do DNA) ou para expressão. DNA codificando o anticorpo monoclonal é facilmente isolado e seqüenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligarem especificamente a genes codificando as cadeias pesada e leve do anticorpo). Muitos vetores são disponíveis. Os componentes de vetor geralmente incluem, porém não estão limitados a, um ou mais dos seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores seletivos, um elemento realçador, um promotor, e uma sequência de terminação de transcrição.

#### (1) Componente de sequência sinal

O anticorpo desta invenção pode ser produzido recombinantemente não apenas diretamente, porém também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo, que é preferivelmente uma sequência sinal ou outro polipeptídeo tendo um sítio de clivagem específico na terminação N de uma proteína madura ou polipeptídeo. A sequência sinal selecionada preferivelmente é aquela que é reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Se células hospedeiras procarióticas não reconhecem e processam a sequência sinal de anticorpo nativo, a sequência sinal pode ser substituída por uma sequência sinal selecionada, por exemplo, do grupo da fosfatase alcalina de liase de pectato (por exemplo, pelB), penicilinase, lpp, ou líderes de enterotoxina II estável ao aquecimento. Para secreção de levedura a sequência sinal nativa pode ser substituída, por exemplo, pela líder de invertase de levedura, uma líder de fator  $\alpha$  (incluindo líderes de fator  $\alpha$  de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), ou

líder de fosfatase de ácido, a líder de *C. albicans* glucoamilase, ou a sinal descrita no WO90/13646. Em expressão de célula mamífera, sequências sinal mamíferas, bem como líderes secretoras virais, por exemplo, a sinal gD de herpes simples, são disponíveis.

- 5 O DNA para tal região precursora é ligado em estrutura de leitura ao DNA codificando o anticorpo.

### (2) Origem de componente de replicação

- 10 Tanto os vetores de expressão quanto de clonagem contêm uma sequência de ácido nucléico que possibilita o vetor replicar-se em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, em vetores de clonagem esta sequência é aquela que possibilita o vetor replicar-se independentemente do DNA cromossômico hospedeiro, e inclui origens de replicação ou sequências de replicação autônoma. Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, levedura e viroses. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem de plasmídeo 2  $\mu$  é adequada para levedura, e várias origens virais são úteis para clonar vetores em células mamíferas. Geralmente, a origem de componente de replicação não é necessária para vetores de expressão mamíferos (a origem SV40 pode tipicamente ser usada apenas por que ela contém o promotor precoce).

### (3) Componente marcador seletivo

- 25 Vetores de expressão e clonagem podem conter um gene seletivo, também denominado um marcador selecionável. Genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, tetraciclina, G418, geneticina, histidinol, ou ácido micofenólico (b) deficiências auxotróficas complementares, ou (c) suprimento de nutrientes críticos não disponíveis de meios complexos, por exemplo, o gene codificando D-alanina racemase para Bacilos.

- 30 Um exemplo de um esquema de seleção utiliza um fármaco para interromper o crescimento de uma célula hospedeira. Aquelas células que são bem sucedidamente transformadas com um gene heterólogo produzem

uma proteína conferindo resistência ao fármaco e desse modo sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam os fármacos metotrexato, neomicina, histidinol, puromicina, ácido micofenólico e higromicina.

5           Outros exemplos de marcadores selecionáveis adequados para células mamíferas são aqueles que possibilitam a identificação de células competentes para apreender ácido nucléico codificando o anticorpo, tais como DHFR, timidina cinase, metalotioneína-I e -II, preferivelmente genes de metalotioneína primatas, adenosina desaminase, ornitina descarboxilase, etc.

10           Por exemplo, células transformadas com o gene de seleção DHFR são primeiro identificadas cultivando-se todos os transformantes em um meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando o DHFR tipo selvagem é empregado é a linhagem de célula de ovário de *hamster* chinês (CHO) deficiente em atividade de DHFR.

15           Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiras tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de DNA codificando o anticorpo da invenção, proteína DHFR tipo selvagem, e outro marcador selecionável tal como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH) pode ser selecionado por crescimento celular em meio contendo um agente de seleção para o marcador selecionável tal como um antibiótico aminoglicosídico, por exemplo, canamicina, neomicina, ou G418. Veja a Patente dos Estados Unidos nº 4.965.199.

25           Um gene de seleção adequado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb e outro, *Nature*, 282: 39 (1979)). O gene *trp1* fornece um marcador de seleção para uma levedura mutante de não tendo a capacidade de desenvolver-se em triptofano, por exemplo, ATCC nº 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). A presença da lesão de *trp1* no genoma de célula hospedeira de levedura então fornece um ambiente eficaz para detectar a transformação por crescimento na ausência de triptofano. Similarmente, linhagens de levedura defici-

entes de Leu2 (ATCC 20,622 ou 38,626) são complementadas por plasmídeos conhecidos transportando o gene Leu2. Linhagens de levedura deficientes de *Ura3* são complementadas por plasmídeos transportando o gene *ura3*.

- 5 Além disso, vetores derivados do plasmídeo circular de 1,6  $\mu$ m pKD1 podem ser usados para a transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, um sistema de expressão para a produção em larga escala de quimosina de bezerro recombinante foi reportado para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). Vetores de expressão de múltiplas
- 10 cópias para a secreção de albumina de soro humano recombinante madura por linhagens industriais de *Kluyveromyces* foram também descritos. Fleer e outro, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

#### (4) Componente Promotor

- Vetores de expressão e clonagem geralmente contêm um pro-
- 15 motor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e é operavelmente ligado ao ácido nucléico codificando o anticorpo. Promotores adequados para uso com hospedeiros procarióticos incluem o promotor de arabinose (por exemplo, *araB*) promotor *phoA*, sistemas de promotor de  $\beta$ -lactamase e lactose, fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (*trp*), e promoto-
- 20 res híbridos tal como o promotor *tac*. Entretanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão uma sequência Shine-Dalgarno (S.D.) operavelmente ligada ao DNA codificando o anticorpo da invenção .

- Sequências promotoras são conhecidas para eucariotas. Virtu-
- 25 almente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do sítio onde a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início de transcrição de muitos genes é a região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma
- 30 sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poli A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão eucarióticos.

Exemplos de sequências promotoras adequadas para uso com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato cinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexocinase, piruvato descarboxilase, fosfofructocinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato cinase, triosefosfato isomerase, fosfoglucose isomerase, e glucocinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis tendo a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, ácido fosfatase, enzimas degradativas associadas com metabolismo de nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vetores e promotores adequados para uso em expressão de levedura são também descritos em EP 73,657. Realçadores de levedura também são vantajosamente usados com promotores de levedura.

Transcrição de anticorpo de vetores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos de genomas de viroses tais como vírus de leucemia Abelson, polioma vírus, vírus do epitélio contagioso, adenovírus (tal como Adenovírus 2), papiloma vírus bovino, sarcoma vírus aviário, o mais preferivelmente citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B vírus, Vírus Símio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de célula hospedeira.

Os promotores precoces e tardios do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição SV40 que também contém a origem viral de SV40 de replicação. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressar DNA em hospedeiros mamíferos usando o papiloma vírus bovino como um vetor é descrito na Patente dos Estados Unidos nº 4.419.446. Uma modificação deste sistemas é descrita na Patente dos Estados Unidos nº 4.601.978. Veja também Reyes e outro, Na-

ture 297: 598-601 (1982) sobre expressão de cDNA de  $\alpha$ -interferon humano em células de camundongo sob o controle de um promotor de timidina cinase de vírus do herpes simples. Alternativamente, a repetição de terminal longo do vírus do sarcoma de Rous pode ser usada como o promotor.

#### 5 (5) Componente de elemento realçador

A transcrição de um DNA codificando o anticorpo desta invenção por eucariotas maiores é frequentemente aumentada inserindo-se uma sequência realçadora no vetor. Muitas sequências realçadoras são atualmente conhecidas de genes mamíferos (globina, elastase, albumina, alfa-fetoproteína, e insulina). Tipicamente, entretanto, alguém usará um realçador de um vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o realçador SV40 no lado tardio da origem de replicação (bp 100-270), o realçador de promotor precoce do citomegalovírus, o realçador de políoma no lado tardio da origem de replicação, e os realçadores de adenovírus. Veja also Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos de realce para ativação de promotores eucarióticos. O realçador pode ser ligado no vetor em uma posição 5' ou 3' à sequência de codificação do anticorpo, porém é preferivelmente localizado em um sítio 5' do promotor.

#### (6) Componente de terminação de transcrição

Os vetores de expressão usados em células hospedeiras eucarióticas (células de levedura, fungos, inseto, planta, animal, humanas, ou nucleadas de outros organismos multicelulares) também conterão sequências necessárias para a terminação de transcrição e para estabilizar o mRNA. Tais sequências são comumente disponíveis das regiões não transladas 5' e, ocasionalmente 3', de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeo transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não transladas do mRNA que codifica o anticorpo. Um componente de terminação de transcrição útil é a região de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino. Veja o WO 94/11026 e o vetor de expressão descrito no mesmo. Outro é o terminador de transcrição de cadeia leve de imunoglobulina de camundongo.

#### (7) Seleção e transformação de células hospedeiras

Células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do DNA nos vetores inclusos são as células procariotas, de levedura, ou eucariotas maiores descritas acima. Os procariotas para este propósito incluem eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *proteus*, *Salmonella*, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41 P descritos em DD 266,710 publicado em 12 de abril de 1989), *pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem do *E. coli* preferido é o *E. coli* 294 (ATCC 31,446), embora outras linhagens tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), e *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) sejam adequadas. Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitantes.

Além dos micróbios procariotas, os eucarióticos tais como fungos filamentosos ou levedura são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vetores codificando o anticorpo. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de padeiro comum, é o mais comumente usado entre os micro-organismos hospedeiros eucarióticos menores. Entretanto, diversos outros gêneros, espécies, e linhagens são comumente disponíveis e úteis aqui, tais como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros de *Kluyveromyces* tais as, por exemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastors* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tais como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungos filamentosos tais como, por exemplo, *Neurospora*, *penicillium*, *Tolypocladium*, e hospedeiros de *Aspergillus* tais como *A. nidulans* e *A. niger*.

Células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpo glicosilado são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de planta e inseto. Numerosas linhagens e

variantes baculovirais e células hospedeiras de inseto permissivas correspondentes de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas), e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de

5 linhagens virais para transfecção são publicamente disponíveis, por exemplo, a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a linhagem Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais viroses podem ser usadas como o vírus incluso de acordo com a presente invenção, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

10 Culturas de célula de planta de algodão, milho, batata, soja, peônia, tomate, tabaco, *lemna*, e outras células de planta podem também ser utilizadas como hospedeiros.

Entretanto, o interesse tem sido maior em células de vertebrado, e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecido) tornou-se procedimento de rotina. Exemplos de linhagens hospedeiras de célula

15 mamífera útil são células de ovário de *hamster* chinês, incluindo células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, e células de ovário de *hamster* chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e outro, proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651);

20 linhagem de rim embriônico humano (células 293 ou 293 subclonada para crescimento em cultura de suspensão, [Graham e outro, *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)]; células de rim de *hamster* bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim

25 de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51);

30 células TRI (Mather e outro, *Annals N.Y Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

Células hospedeiras são transformadas ou transfectadas com os vetores de expressão ou clonagem acima descritos para a produção de anticorpo e cultivadas em meios de nutriente convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes codificando as sequências desejadas. Além disso, novos vetores e linhagens de célula transformada com múltiplas cópias de unidades de transcrição separadas por um marcador seletivo são particularmente úteis e preferidas para a expressão de anticorpos .

#### (8) Cultivando as células hospedeiras

As células hospedeiras usadas para produzir o anticorpo desta invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) são adequados para cultivar as células hospedeiras. Além disso, qualquer dos meios descritos em Ham e outro, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes e outro, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes dos Estados Unidos nºs 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, ou 5.122.469, WO 90103430; WO 87/00195; ou Patente dos Estados Unidos Re. nº 30.985 podem ser usadas como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado quando necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleotídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tal como o fármaco Gentamicin□), elementos de traço (definidos como compostos inorgânicos geralmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que sejam conhecidas por aqueles versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e similares, são aquelas anteriormente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e será evidente para o técnico ordinariamente versado.

### (9) Purificação de anticorpo

Quando usando técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico, ou diretamente secretado no meio, inclusive de culturas microbianas. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os resíduos particulados, ou células hospedeiras ou fragmentos lisados, serão removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Better e outro *Science* 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); e *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 457-461 (1993) descrevem um procedimento para isolar anticorpos que são secretados para o espaço periplásmico de *E. coli*. (Veja also, [Carter e outro, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)].

A composição de anticorpo preparada de células microbianas ou mamíferas pode ser purificada usando, por exemplo, cátion de cromatografia de hidroxilapatita ou cromatografia de permuta aviária, e cromatografia de afinidade, com a cromatografia de afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da proteína A como um ligante de afinidade depende das espécies e isótipo de qualquer domínio de Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , ou  $\gamma 4$  humanas (Lindmark e outro, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isótipos de camundongo e para  $\gamma 3$  humano (Guss e outro, *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade está ligado é mais frequentemente agarose, porém outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vítreas de poro controlado ou poli(estirenodivinil)benzeno provêm taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos do que pode ser obtido com a agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio  $C_H3$ , a resina Bakerbond ABX $\square$  (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteína tais como fracionamento em uma coluna de permuta de íon, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em cromatografia SEPHAROSE $\square$  de heparina em uma resina de permuta de ânion ou cátion (tal como uma coluna de

ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio são também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

### Anticorpos Quiméricos

- 5                   Anticorpo de roedor em administração *in vivo* repetida em homem ou sozinho ou como um conjugado trará cerca de uma resposta imune no recipiente contra o anticorpo de roedor; a resposta de HAMA assim chamada (Anticorpo Anti-Camundongo Humano). A resposta de HAMA pode limitar a eficácia do produto farmacêutico se dosagem repetida for requerida.
- 10               A imunogenicidade do anticorpo pode ser reduzida por modificação química do anticorpo com um polímero hidrofílico tal como polietileno glicol ou usando métodos de engenharia genética para tornar a estrutura de anticorpo mais semelhante à humana, por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou Human Engineered™. Por que tais anticorpos construídos
- 15               são menos imunogênicos em humanos do que os anticorpos monoclonais de camundongo parenterais, eles podem ser usados para o tratamento de humanos com muito menos risco de anafilaxia. Desse modo, estes anticorpos podem ser preferidos em aplicações terapêuticas que envolvem a administração *in vivo* a um humano.
- 20               Anticorpos monoclonais quiméricos, em que os domínios de Ig variáveis de um anticorpo monoclonal de camundongo são fundidos a domínios Ig constantes humanos, podem ser gerados usando procedimentos padrões conhecidos na técnica (Veja Morrison, S. L., e outro (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human
- 25               Constant Region Domains, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6841-6855; and, Boulianne, G. L., e outro, *Nature* 312, 643-646 . (1984)). Por exemplo, as sequências de gene para os domínios variáveis do anticorpo de roedor que ligam-se a CEA podem ser substituídas pelos domínios variáveis de uma proteína de mieloma humano, desse modo produzindo um anticorpo quimérico
- 30               recombinante. Estes procedimentos são detalhados nas EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 e WO 86/01533. Embora alguns anticorpos monoclonais quiméricos tenham se provado menos imu-

nogênicos em humanos, os domínios Ig variáveis de camundongo podem também induzir a uma resposta anti-camundongo humana significativa.

### Anticorpos Humanizados

Anticorpos humanizados podem ser obtidos por uma variedade de métodos incluindo, por exemplo: (1) enxerto de regiões de determinação de complementariedade não-humanas (CDRs) sobre uma estrutura humana e região constante (um processo referido na técnica como humanizante por meio de "enxerto de CDR"), ou, alternativamente, (2) transplante dos domínios variáveis não-humanos inteiros, porém "disfarçando" os com uma superfície semelhante à humana por substituição de resíduos de superfície (um processo referido na técnica como "polimento"). Na presente invenção, anticorpos humanizados incluirão tanto anticorpos "humanizados" quanto "polidos". Estes métodos são descritos, por exemplo, em Jones e outro, *Nature* 321:522 525 (1986); Morrison e outro, *proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851 6855 (1984); Morrison e Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65 92 (1988); Verhoeyer e outro, *Science* 239:1534 1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489 498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169 217 (1994); e Kettleborough, C.A. e outro, *protein Eng.* 4(7):773 83 (1991) cada dos quais é incorporado aqui por referência.

Por exemplo, as sequências de gene das CDRs do anticorpo de roedor podem ser isoladas ou sintetizadas e substituídas pelas regiões de sequência correspondentes de um gene de anticorpo humano homólogo, produzindo um anticorpo humano com a especificidade do anticorpo de roedor original. Estes procedimentos são descritos nos EP 023940, WO 90/07861 e WO 91/09967.

O enxerto de CDR que envolve introduzir uma ou mais das seis CDRs dos domínios de Ig variáveis de cadeia pesada e leve de camundongo nas quatro regiões de estrutura apropriadas de domínios Ig variáveis humanos é chamado enxerto de CDR. Esta técnica (Riechmann, L., e outro, *Nature* 332, 323 (1988)), utiliza as regiões de estrutura conservadas (FR1-FR4) como um andaime para sustentar as alças de CDR que são os contatos primários com o antígeno. Uma desvantagem do enxerto de CDR, entretanto, é

que ele pode resultar em um anticorpo humanizado que tem uma afinidade de ligação substancialmente menor do que o anticorpo de camundongo original, por que os aminoácidos das regiões de estrutura podem contribuir para a ligação de antígeno, e por que os aminoácidos das alças de CDR podem influenciar a associação dos dois domínios de Ig variáveis. Para manter a afinidade do anticorpo monoclonal humanizado, a técnica de enxerto de CDR pode ser melhorada escolhendo-se regiões de estrutura humana que se pareçam mais intimamente com as regiões de estrutura do anticorpo de camundongo original, e por mutagênese direcionada ao sítio de aminoácidos individuais dentro da estrutura ou CDRs auxiliada por modelagem de computador do sítio de ligação de antígeno (por exemplo, Co, M. S., e outro (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976).

Um método de humanizar anticorpos compreende alinhar as sequências de cadeia pesada e leve não-humanas às sequências de cadeia pesada e leve humanas, selecionando e substituindo a estrutura não-humana com uma estrutura humanas com base em tal alinhamento, modelagem molecular para predizer a conformação da sequência humanizada e comparando à conformação do anticorpo origem. Este processo é seguido por nova mutação repetida de resíduos na região de CDR que atrapalha a estrutura das CDRs até a conformação predita do modelo de sequência humanizada aproximar-se intimamente da conformação das CDRs não-humanas do anticorpo não-humano origem. Tais anticorpos humanizados podem ser também derivatizados para facilitar a captação e depuração, por exemplo, por meio de receptores Ashwell (veja, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos nºs 5.530.101 e 5.585.089 cujas patentes são incorporadas asqui por referência).

Diversas humanizações de anticorpos monoclonais de camundongo por projeto racional foram reportadas (veja, por exemplo, 20020091240 publicado em 11 de julho de 2002, WO 92/11018 e Patente dos Estados Unidos nº 5.693.762, Patente dos Estados Unidos nº 5.766.866).

Anticorpos Human Engineered™

A frase "anticorpo Human Engineered™" refere-se a um anticorpo derivado de um anticorpo não-humano, tipicamente um anticorpo monoclonal de camundongo. Alternativamente, um anticorpo Human Engineered™ pode ser derivado de um anticorpo quimérico que retém ou substancialmente retém as propriedades de ligação de antígeno do anticorpo, não-humano, origem, porém que exibe imunogenicidade diminuída quando em comparação ao anticorpo origem quando administrado a humanos.

Human Engineering™ de domínios variáveis de anticorpo foi descrito por Studnicka [veja, por exemplo, Studnicka e outro, Patente dos Estados Unidos nº 5.766.886; Studnicka e outro Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como um método para reduzir a imunogenicidade, ao mesmo tempo que mantendo a atividade de ligação de moléculas de anticorpo. De acordo com o método, cada aminoácido de região variável foi designado um risco de substituição. As substituições de aminoácido são distinguidas por uma das três categorias de risco : (1) mudanças de baixo risco são aquelas que têm o maior potencial para reduzir a imunogenicidade com a menor chance de romper a ligação de antígeno; (2) mudanças de risco moderado são aquelas que também reduziriam a imunogenicidade, porém têm uma maior chance de afetar a ligação de antígeno ou duplicação da proteína; (3) resíduos de alto risco são aqueles que são importantes para ligação ou para manter a estrutura do anticorpo e transportam o maior risco de que a ligação de antígeno ou duplicação de proteína seja afetada. Devido ao papel estrutural tri-dimensional das prolinas, modificações nas prolinas são geralmente consideradas ser alterações de risco pelo menos moderado, mesmo se a posição for tipicamente uma posição de baixo risco.

Regiões variáveis das cadeias leve e pesadas de um anticorpo de roedor são Human Engineered™ como segue para aminoácidos humanos substitutos em posições determinadas serem improváveis de adversamente afetarem qualquer ligação de antígeno ou duplicação de proteína, porém provavelmente reduzem a imunogenicidade em um ambiente humano. Resíduos de aminoácido que estão em posições de "baixo risco" e que são candidatos para modificação de acordo com o método são identificados

por alinhamento das sequências de aminoácido das regiões variáveis de roedor com uma sequência de região variável humana. Qualquer região variável humana pode ser usada, incluindo uma sequência VH ou VL individual ou uma sequência VH ou VL de consenso humana ou uma sequência de

5 linha germinativa humana individual ou de consenso. Os resíduos de aminoácido em qualquer número das posições de baixo risco, ou em todas as posições de baixo risco, podem ser mudados. Por exemplo, em cada posição de baixo risco onde os resíduos de aminoácido murinos e humanos alinhados diferem, uma modificação de aminoácido é introduzida, que substitui o

10 resíduo de roedor com o resíduo humano. Alternativamente, os resíduos de aminoácido em todas as posições de baixo risco e em qualquer número das posições de risco moderado podem ser mudados. Idealmente, para obter a mínima imunogenicidade todas as posições de baixo e moderado risco são mudadas de sequência de roedor para humana.

15 Genes sintéticos contendo regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve modificadas são construídos e ligados às regiões constantes de cadeia  $\gamma$  pesada e/ou cadeia  $\kappa$  leve humanas. Quaisquer regiões constantes de cadeia pesada e cadeia leve humanas podem ser usadas em combinação com as regiões variáveis de anticorpo Human Engineered™, incluindo IgA

20 (de qualquer subclasse, tal como IgA1 ou IgA2), IgD, IgE, IgG (de qualquer subclasse, tal como IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4), ou IgM. Os genes de cadeia pesada e leve humanos são introduzidos em células hospedeiras, tais como células mamíferas, e os produtos de imunoglobulina recombinante resultantes são obtidos e caracterizados.

## 25 Anticorpos humanos para animais transgênicos

Anticorpos humanos para antígeno alvo podem também ser produzidos usando animais transgênicos que não têm nenhuma produção de imunoglobulina endógena e são construídos para conter locos de imunoglobulina humana. Por exemplo, o WO 98/24893 descreve animais transgênicos tendo um loco Ig humano em que os animais não produzem imunoglobulinas endógenas funcionais devido à inativação de locos de cadeia pesada e

30 leve endógena. O WO 91/10741 também descreve hospedeiros mamíferos

não-primatas transgênicos capazes de montar uma resposta imune para um imunógeno, onde os anticorpos têm regiões contantes e/ou variáveis de primata, e onde os locos codificando imunoglobulina endógena são substituídos ou inativados. O WO 96/30498 descreve o uso do sistema Cre/Lox para  
5 modificar o loco da imunoglobulina em um mamífero, tal como para substituir toda ou uma porção da região constante ou variável para formar uma molécula de anticorpo modificada. O WO 94/02602 descreve hospedeiros mamíferos não-humanos tendo locos de Ig endógenos inativados e locos de Ig humanos funcionais. A Patente dos Estados Unidos nº 5.939.598 descreve  
10 métodos de preparar camundongos transgênicos em que os camundongos não possuem cadeias pesadas endógenas, e expressam um loco de imunoglobulina exógena compreendendo uma ou mais regiões constantes xenogênicas.

Usando um animal transgênico descrito acima, uma resposta  
15 imune pode ser produzidas para uma molécula antigênica selecionada, e células produtoras de anticorpo podem ser removidas do animal e usadas para produzir hibridomas que secretam anticorpos monoclonais humanos. Protocolos de imunização, adjuvantes e similares são conhecidos na técnica, e são usados em imunização de, por exemplo, um camundongo transgênico  
20 como descrito no WO 96/33735. Esta publicação descreve anticorpos monoclonais contra uma variedade de moléculas antigênicas incluindo IL 6, IL 8, TNFa, CD4 humana, L selectina, gp39, e toxina do tétano. Os anticorpos monoclonais podem ser testados quanto à capacidade de inibir ou neutralizar a atividade biológica ou efeito fisiológico da proteína correspondente. O  
25 WO 96/33735 descreve que anticorpos monoclonais contra a IL-8, derivados de células imunes de camundongos transgênicos imunizados com IL-8, bloquearam as funções induzidas por IL-8 dos neutrófilos. Anticorpos monoclonais humanos com especificidade para o antígeno usados para imunizar animais transgênicos são também descritos no WO 96/34096 e pedido de  
30 Patente dos Estados Unidos nº 20030194404; e pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20030031667). veja also Jakobovits e outro, proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits e outro, Nature, 362:255-258

(1993); Bruggermann e outro, Year in Immuno., 7:33 (1993); e Patente dos Estados Unidos nº 5.591.669, Patente dos Estados Unidos nº 5.589.369, Patente dos Estados Unidos nº 5.545.807; e Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20020199213, WO 96/34096 e Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20030194404; e pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20030031667.

Animais transgênicos adicionais úteis para preparar anticorpos monoclonais incluem o Medarex HuMAb-MOUSE®, descrito na Patente dos Estados Unidos nº 5.770.429 e Fishwild, e outro (Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996), que contém sequências de gene de genes de anticorpo humano não redispostos que codificam para as cadeias pesada e leve dos anticorpos humanos. Imunização de um HuMAb-MOUSE® possibilita a produção de anticorpos monoclonais para a proteína alvo.

Além disso, Ishida e outro (Cloning Stem Cells. 4:91-102, 2002) descrevem o TransChromo Mouse (TCMOUSE™) que compreende segmentos de tamanho de megabase de DNA humano e que incorpora os locos de imunoglobulina humana inteiros (hlg). O TCMOUSE tem um repertório totalmente diverso de hlg, incluindo todas as subclasses de IgGs (IgG1-G4). A imunização do TCMouse com vários antígenos humanos produz respostas de anticorpo compreendendo anticorpos humanos.

O Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20030092125 descreve métodos para influenciar a resposta imune de um animal para o epítopo desejado. Anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (veja as Patentes dos Estados Unidos nºs 5.567.610 e 5.229.275).

#### Anticorpos de tecnologia de exibição de fago

O desenvolvimento de tecnologias para preparar repertórios de genes de anticorpo humano recombinante, e a exibição dos fragmentos de anticorpo codificados sobre a superfície de bacteriófago filamentosos, forneceu um método recombinante de diretamente preparar e selecionar anticorpos humanos, que também podem ser aplicados a anticorpos humanizados, quiméricos, murinos ou muteína. Os anticorpos produzidos pela tecnologia

de fago são produzidos como fragmentos de ligação a antígeno – geralmente fragmentos Fv ou Fab – em bactérias e desse modo não possuem funções efetoras. As funções efetoras podem ser introduzidas por uma das duas estratégias: Os fragmentos podem ser construídos ou em anticorpos completos para expressão em células mamíferas, ou em fragmentos de anticorpo biespecífico com um segundo sítio de ligação capaz de disparar uma função efetora.

Tipicamente, o fragmento Fd ( $V_H-C_H1$ ) e cadeia leve ( $V_L-C_L$ ) de anticorpos são separadamente clonados por PCR e recombinados randomizadamente em bibliotecas de exibição de fago, que podem então ser selecionadas para ligação a um antígeno particular. Os fragmentos de Fab são expressos sobre a superfície do fago, isto é, fisicamente ligados aos genes que codificam os mesmos. Desse modo, a seleção de Fab por ligação de antígeno co-seleciona para sequências codificando Fab, que podem ser amplificadas subsequentemente. Por diversos ciclos de ligação de antígeno e reamplificação, um procedimento denominado panículação, Fab específico para o antígeno é enriquecido e finalmente isolado.

Em 1994, um método para humanização de anticorpos, chamado "seleção orientada", foi descrito. A seleção orientada utiliza a força da técnica de exibição de fago para a humanização de anticorpo monoclonal de camundongo (veja Jaspers, L. S., e outro, *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)). Para isso, o fragmento Fd do anticorpo monoclonal de camundongo pode ser exibido em combinação com uma biblioteca de cadeia leve humana, e a biblioteca de Fab híbrida resultante pode então ser selecionada com o antígeno. O fragmento de Fd de camundongo desse modo fornece um padrão para orientar a seleção. Subsequentemente, as cadeias leves humanas selecionadas são combinadas com uma biblioteca de fragmento Fd humano. A seleção da biblioteca resultante produz Fab totalmente humano.

Uma variedade de procedimentos foi descrita para derivar anticorpos humanos de bibliotecas de exibição de fago (veja, por exemplo, Hoo-genboom e outro, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks e outro, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Patentes dos Estados Unidos n<sup>os</sup> 5.565.332 e

5.573.905; Clackson, T., e Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). Em particular, a seleção e evolução *in vitro* de anticorpos derivados de bibliotecas de exibição de fago tornou-se uma poderosa ferramenta (veja Burton, D. R., e Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); e, Winter, G., e outro, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20020004215 e WO 92/01047; Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20030190317 publicado em 9 de outubro de 2003 e Patente dos Estados Unidos nº 6.054.287; Patente dos Estados Unidos nº 5.877.293.

10                   Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193, e Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 200120030044772 publicado em 6 de março de 2003 descrevem métodos para analisar bibliotecas de anticorpo exposto por fago ou outras moléculas de ligação por levantamento de captura, um método envolvendo a i-

15                   mobilização das moléculas de ligação candidatas sobre um suporte sólido.

                  Os produtos de anticorpo podem ser analisados quanto à atividade e quanto à adequabilidade nos métodos de tratamento da invenção usando ensaios como descrito na seção intitulada "Métodos de Avaliação" in-

20                   clusa ou usando quaisquer ensaios adequados conhecidos na técnica.

#### Muteínas de sequência de aminoácido

                  Anticorpos da invenção incluem muteínas de um anticorpo origem onde a sequência de polipeptídeo do anticorpo origem foi alterada em pelo menos uma substituição, deleção ou inserção de aminoácido na região

25                   variável ou na porção equivalente à região variável, incluindo dentro as CDRs, contanto que a muteína retenha a afinidade de ligação desejada ou a atividade biológica. As muteínas podem ser substancialmente homólogas ou substancialmente idênticas ao anticorpo origem, por exemplo, pelo menos

30                   65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% idênticas ou homólogas. A identidade ou homologia com respeito a esta sequência é definida aqui como a percentagem de resíduos de aminoácido na sequência

candidata que são idênticos à sequência origem, após alinhamento das sequências e introdução de lacunas, se necessário, para obter a identidade de sequência percentual máxima, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. Nenhuma das extensões de terminal N, terminal C, ou internas, deleções, ou inserções na sequência de anticorpo deve ser construída como afetando a identidade ou homologia da sequência. Desse modo, a identidade de sequência pode ser determinada por métodos padrões que são comumente usados para comparar a similaridade em posição dos aminoácidos de dois polipeptídeos. Usando um programa de computador tal como BLAST ou FASTA, dois polipeptídeos são alinhados para pareamento ideal de seus respectivos aminoácidos (ou longos ou de tamanho natural de uma ou ambas as sequências, ou uma porção predeterminada longa de uma ou ambas as sequências). Os programas fornecem uma penalidade de abertura de referência e uma penalidade lacuna de referência, e uma matriz de classificação tal como PAM 250 [uma matriz de classificação padrão; veja Dayhoff e outro, em *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supl. 3 (1978)] podem ser usados em conjunto com o programa de computador. Por exemplo, a identidade percentual pode então ser calculada como: o número total de pareamentos idênticos multiplicado por 100 e em seguida dividido pela soma do comprimento da sequência mais longa dentro do ciclo pareado e o número de lacunas introduzidas nas sequências mais longas a fim de alinhar as duas sequências.

Anticorpos da invenção podem também incluir alterações na sequência de polipeptídeo da região constante, que não afetará a afinidade de ligação, porém pode alterar a função efetora, tal como toxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC) ou depuração e captação (e o efeito resultante sobre a meia-vida).

### Inserções

As inserções de sequência de aminoácido incluem fusões de terminal amino- e/ou carboxila variando em comprimento de um resíduo a polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequência de resíduos de aminoácido único ou múltiplos, por exemplo, 2, 3

ou mais. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo de metionila de terminal N ou o anticorpo (incluindo fragmento de anticorpo) fundido a um rótulo de epítipo ou um epítipo de receptor de salvamento. Outras muteínas insercionais da molécula de anticorpo incluem a

5 adição de sítios de glicosilação, adição de cisteínas para ligação intramolecular ou intermolecular, ou fusão a um polipeptídeo que aumenta a meia-vida de soro do anticorpo, por exemplo, na terminal N ou terminal C. Por exemplo, a(s) ligação(coes) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo para melhorar sua estabilidade (particularmente onde o anticorpo é um

10 fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

A glicosilação de anticorpos é tipicamente ou ligada por N ou ligada por O. Ligada por N refere-se à ligação da porção de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripeptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido

15 exceto prolina, são sequências de reconhecimento para ligação enzimática da porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. A presença de qualquer destas sequências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Desse modo, sítios de glicosilação ligados por N podem ser adicionados a um anticorpo alterando a sequência de aminoácido

20 de modo que ela contenha uma ou mais destas sequências de tripeptídeo. A glicosilação ligada por O refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora a 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxisilina possa também ser usada. Os sítios de glicosilação ligados por O podem ser

25 adicionados a um anticorpo inserindo-se ou substituindo-se um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original.

O termo "rotulado por epítipo" refere-se ao anticorpo fundido a um rótulo de epítipo. O polipeptídeo de rótulo de epítipo tem resíduos suficientes para fornecer um epítipo contra o qual um anticorpo neste contexto

30 pode ser preparado, todavia é suficientemente curto de modo que ele não interfira com a atividade do anticorpo. O rótulo de epítipo preferivelmente é suficientemente único de modo que o anticorpo neste contexto contra não

interaja substancialmente com outros epítomos. Os polipeptídeos de rótulo adequados geralmente têm pelo menos 6 resíduos de aminoácido e geralmente entre cerca de 8 a 50 resíduos de aminoácido (preferivelmente entre cerca de 9 a 30 resíduos). Exemplos incluem o polipeptídeo rótulo flu HA e seu anticorpo 12CA5 [Field e outro, *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159-2165 (1988)]; the c-myc tag e the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 antibodies thereto [Evan e outro, *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3610-3616 (1985)]; e o rótulo de glicoproteína D do vírus do Herpes Simples (gD) e seu anticorpo [Paborsky e outro, *protein Engineering* 3(6): 547-553 (1990)]. Outros rótulos exemplares são uma sequência de poli-histidina, geralmente em torno de seis resíduos de histidina, que permitem o isolamento de um composto desse modo rotulado usando a quelação de níquel. Outras etiquetas e rótulos, tal como o rótulo FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), bem conhecidos e rotineiramente usados na técnica são abrangidos pela invenção.

Como usado aqui, o termo "epítomo de ligação de receptor de salvamento" se refere a um epítomo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, ou IgG<sub>4</sub>) que é responsável pelo aumento da meia vida de soro *in vivo* da molécula de IgG.

#### Deleções

As deleções de sequência de aminoácido incluem deleções de terminal de amino e/ou carboxila variando no comprimento de um a cem ou mais resíduos, resultando em fragmentos que retêm a afinidade de ligação para o antígeno alvo, bem como deleções de intra-sequências de resíduos de aminoácido único ou múltiplo, por exemplo, 2, 3 ou mais. Por exemplo, os sítios de glicosilação podem ser deletados ou movidos para uma posição diferente por deleção de parte ou todos dos tripeptídeos ou outras sequências de reconhecimento para glicosilação.

#### Substituições

Outro tipo de muteína é uma muteína de substituição de aminoácido. Estas muteínas têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo removida e um resíduo diferente inserido em seu lugar. A mutagênese substitucional em qualquer das regiões hipervariáveis ou CDR

ou regiões de esqueleto é contemplada. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 2. A substituição mais conservativa é encontrada sob o título de "substituições preferidas". Se tais substituições resultam em nenhuma alteração na atividade biológica, então mais alterações substanciais, denominadas "substituições exemplares" na Tabela 1, ou como também descrito abaixo em referência às classes de aminoácido, podem ser introduzidas e os produtos avaliados.

TABELA 2

|    | <u>Original</u> | <u>Exemplar</u>                        | <u>Substituições de<br/>Resíduo Preferidas</u> |
|----|-----------------|----------------------------------------|------------------------------------------------|
| 10 | Ala (A)         | val; leu; ile                          | val                                            |
|    | Arg (R)         | lys; gln; asn                          | lys                                            |
|    | Asn (N)         | gln; his; asp, lys; gln                | arg                                            |
|    | Asp (D)         | glu; asn                               | glu                                            |
| 15 | Cys (C)         | ser; ala                               | ser                                            |
|    | Gln (Q)         | asn; glu                               | asn                                            |
|    | Glu (E)         | asp; gln                               | asp                                            |
|    | Gly (G)         | ala                                    |                                                |
|    | His (H)         | asn; gln; lys; arg                     |                                                |
| 20 | Ile (I)         | leu; val; met; ala;<br>phe;            | leu                                            |
|    | Leu (L)         | norleucine; ile; val;<br>met; ala; phe | ile                                            |
|    | Lys (K)         | arg; gln; asn                          | arg                                            |
| 25 | Met (M)         | leu; phe; ile                          | leu                                            |
|    | Phe (F)         | leu; val; ile; ala; tyr                |                                                |
|    | Pro (P)         | ala                                    |                                                |
|    | Ser (S)         | thr                                    |                                                |
|    | Thr (T)         | ser                                    | ser                                            |
| 30 | Trp (W)         | tyr; phe                               | tyr                                            |
|    | Tyr (Y)         | trp; phe; thr; ser                     | phe                                            |
|    | Val (V)         | ile; leu; met; phe;<br>ala; norleucina | leu                                            |

As modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são efetuadas selecionando-se substituições que diferem significativamente em seu efeito em manter (a) a estrutura do esqueleto de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação helicoidal ou folha, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base nas propriedades de cadeia lateral comuns:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile,;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr,;
- (3) ácido: asp, glu,;
- (4) básico: asn, gln, seu, lys, arg,;
- (5) resíduos que influenciam a orientação de cadeia: gly, pro; e
- (6) aromático: trp, tyr, phe.

As substituições conservadoras envolvem substituir um aminoácido com outro membro de sua classe. As substituições não conservadoras envolvem substituir um membro de uma destas classes com um membro de outra classe.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na conservação da conformação apropriada do anticorpo também pode ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir a reticulação aberrante.

A maturação por afinidade geralmente envolve a preparação e avaliação de muteínas de anticorpo que têm substituições dentro dos CDRs de um anticorpo origem e selecionar muteínas que melhoraram propriedades biológicas tal como afinidade de ligação relativo ao anticorpo origem. Um modo conveniente por gerar tais muteínas substitucionais é a maturação por afinidade usando exibição de fago. Brevemente, vários sítios de região hipervariável (por exemplo, 6-7 sítios) são mutados para gerar todas possíveis substituições de amino em cada sítio. As muteínas de anticorpo desse modo geradas são exibidas de um modo monovalente de partículas de fago filamentosas como fusões ao produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As muteínas exibidas por fago são então avaliadas quanto a sua

atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação). Veja por exemplo, WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 e WO 93/19172.

Os métodos de maturação por afinidade de anticorpo atuais pertencem a duas categorias de mutagênese: estocástica e não estocástica.

- 5 PCR propenso a erro, cepas bacterianas mutadoras (Low e outros, *J. Mol. Biol.* 260, 359-68, 1996), e mutagênese de saturação (Nishimiya e outros *J. Biol. Chem.* 275:12813-20, 2000; Chowdhury, P., S. *Methods Mol. Biol.* 178, 269-85, 2002) são exemplos típicos de métodos de mutagênese estocástica (Rajpal e outros, *Proc Natl Acad Sci U S o A.* 102:8466-71, 2005). As técnicas
- 10 não estocásticas usam freqüentemente mutagênese de varredura de alanina ou direcionada ao sítio para gerar coleções limitadas de muteínas específicas. Alguns métodos são descritos em detalhes adicionais abaixo.

- Maturação por afinidade por métodos de paniculação - A maturação por afinidade de anticorpos recombinantes geralmente é realizada por
- 15 várias rodadas de paniculação de anticorpos candidatos na presença de quantidades decrescentes de antígeno. A diminuição da quantidade de antígeno por rodada seleciona os anticorpos com a afinidade mais elevada para o antígeno desse modo produzindo anticorpos de afinidade elevada de um grande grupo de material de partida. A maturação por afinidade por paniculação é bem conhecida na técnica e é descrita, por exemplo, em Huls e outros (*Cancer Immunol Immunother.* 50:163-71, 2001). Os métodos de maturação por afinidade que usam tecnologias de exibição de fago são descritos em outro lugar aqui e conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Daugherty e outros, *Proc Natl Acad Sci U S o A.* 97:2029-34, 2000).
  - 20

- 25 Mutagênese Total - Uma mutagênese total (LTM) (Rajpal e outros, *Proc Natl Acad Sci U S o A.* 102:8466-71, 2005) fornece um método para rapidamente traçar o sítio de ligação de anticorpo. Para LTM, nove aminoácidos, representantes das químicas de cadeia lateral principais fornecidos pelos 20 aminoácidos naturais, são selecionados para dissecar as contribuições de cadeia lateral funcionais para ligar a toda posição em todos os
- 30 seis CDRs de um anticorpo. LTM gera uma série posicional de mutações únicas em um CDR onde cada resíduo do "tipo selvagem" é sistematicamen-

te substituído por um dos nove aminoácidos. Os CDRs mutados são combinados para gerar bibliotecas de fragmento variável de cadeia única combinatória (scFv) de complexidade e tamanho crescentes sem ficar proibitivo à exibição quantitativa de todas as muteínas. Após seleção positiva, os clones com ligação melhorada são seqüenciados, e as mutações benéficas são traçadas.

PCR propenso a erro - O PCR propenso a erro envolve a aleatorização de ácidos nucleicos entre rodadas de seleção diferentes. A aleatorização ocorre em uma baixa taxa pela taxa de erro intrínseca da polimerase usada porém pode ser aumentada por PCR propenso a erro (Zaccolo e outros J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999) usando uma polimerase que tem uma taxa de erro intrínseca elevada durante a transcrição (Hawkins e outros, J Mol Biol. 226:889-96, 1992). Depois das rodadas de mutação, os clones com afinidade melhorada para o antígeno são selecionados usando métodos rotineiros na técnica.

Embaralhamento de DNA - O embaralhamento de ácido nucleico é um método para recombinação homóloga *in vitro* ou *in vivo* de grupos de polinucleotídeos mais curtos ou menor para produzir polinucleotídeos variantes. O embaralhamento de DNA foi descrito na Patente US N°. 6.605.449, Patente US 6.489.145, WO 02/092780 e Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-51 (1994). Geralmente, o embaralhamento de DNA é compreendido de 3 etapas: fragmentação dos genes a serem embaralhados com DNase I, hibridação aleatória de fragmentos e montagem ou carregamento no gene fragmentado por PCR na presença de DNA polimerase (PCR sexual), e amplificação de produto montado por PCR convencional.

O embaralhamento de DNA difere de PCR propenso a erro pelo fato de que é uma reação de cadeia reversa. Em PCR propenso a erro, o número de sítios iniciais de polimerase e o número de moléculas crescem exponencialmente. Em contraste, na montagem ou embaralhamento de ácido nucleico de polinucleotídeos aleatórios o número de sítios iniciais e o número (porém não tamanho) dos polinucleotídeos aleatórios diminuem com o passar do tempo.

No caso de um anticorpo, o embaralhamento de DNA permite a associação combinatória livre de todos os CDR1s com todos os CDR2s com todos os CDR3s, por exemplo. É contemplado que as múltiplas famílias de sequências possam ser embaralhadas na mesma reação. Além disso, o embaralhamento geralmente conserva a ordem relativa, tal que, por exemplo, CDR1 não seja encontrado na posição de CDR2. Os embaralhamentos raros conterão um número grande dos melhores CDRs (por exemplo, afinidade mais elevada) e estes embaralhamentos raros podem ser selecionados com base em sua afinidade superior.

O polinucleotídeo modelo que pode ser usado no embaralhamento de DNA pode ser DNA ou RNA. Pode ser de vários comprimentos que dependem do tamanho do gene ou polinucleotídeo mais curto ou menor para ser recombinado ou montado. Preferivelmente, o polinucleotídeo modelo é de 50 bp a 50 kb. O polinucleotídeo modelo freqüentemente deveria ser de filamento duplo.

É contemplado que polinucleotídeos de ácido nucléico de filamento duplo ou filamento único que têm regiões de identidade com o polinucleotídeo modelo e regiões de heterologia com o polinucleotídeo modelo podem ser adicionados ao polinucleotídeo modelo, durante a etapa inicial de seleção de gene. Também é contemplado que dois modelos de polinucleotídeo diferentes, porém relacionados possam ser misturados durante a etapa inicial.

*Varredura de alanina* – A mutagênese de varredura de alanina pode ser realizada para identificar os resíduos de região hipervariável que contribuem significativamente com a ligação de antígeno. Cunningham e Wells, (Science 244:1081-1085, 1989). Um resíduo ou grupo de resíduos alvos são identificados (por exemplo, resíduos carregados tal como arg, asp, his, lys, e glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. Esses locais de aminoácido que demonstram sensibilidade funcional às substituições então são refinados introduzindo-se também ou outras mutações em, ou para, os sítios de substituição.

Desse modo, ao mesmo tempo em que o sítio para introduzir uma mudança de sequência de aminoácido é predeterminado, a natureza da mutação por se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um determinado sítio, a varredura de ala ou mutagênese aleatória é conduzida para o códon ou região alvo e as muteínas de anticorpo expressas são avaliadas quanto à atividade desejada.

Desígnio auxiliado por computador- Alternativamente, ou além disso, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e antígeno, ou usar software de computador para modelar tais pontos de contato. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são os candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas aqui. Uma vez que tais muteínas são geradas, o painel de muteínas é submetido à avaliação como descrito aqui e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

A maturação por afinidade envolve a preparação e avaliação de muteínas de anticorpo que têm substituições nos CDRs de um anticorpo origem e selecionar as muteínas que têm propriedades biológicas melhoradas tal como afinidade de ligação relativa ao anticorpo origem. Um modo conveniente para gerar tais muteínas substitucionais é a maturação por afinidade que usa exibição de fago. Resumidamente, vários sítios de região hipervariáveis (por exemplo, 6-7 sítios) são mutados para gerar todas possíveis substituições de amino em cada sítio. As muteínas de anticorpo desse modo geradas são exibidas de um modo monovalente de partículas de fago filamentosas como fusões ao produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As muteínas exibidas por fago são então avaliadas quanto à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação).

A mutagênese de varredura de alanina pode ser realizada para identificar os resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente com a ligação de antígeno. Alternativamente, ou além disso, pode ser benéfico analisar uma estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e antígeno. Tais resíduos

de contato e resíduos vizinhos são os candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas aqui. Uma vez tais muteínas são geradas, o painel de muteínas é submetido à avaliação como descrito aqui e anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes pode ser selecionados para desenvolvimento adicional.

#### Função efetora alterada

Outras modificações do anticorpo são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção com respeito à função efetora, para aumentar a efetividade do anticorpo no tratamento de uma doença ou distúrbio relacionado com EphB3-, por exemplo. Por exemplo, o resíduo de cisteína pode ser introduzido na região de Fc, desse modo permitindo a formação de ligação de dissulfeto de intercadeia nesta região. O anticorpo homodimérico desse modo gerado pode ter capacidade de internalização aumentada e/ou morte de célula mediada por complemento aumentado e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Veja Caron e outros, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B., J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Os anticorpos homodiméricos com atividade aumentada também podem ser preparados usando reticuladores heterobifuncionais como descrito em Wolff e outros, Câncer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser construído o qual tenha regiões Fc duais e possa desse modo ter aumentado lise de complemento relacionada e capacidades de ADCC. Veja Stevenson e outros, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989). Além disto, foi mostrado que sequencias dentro de CDR podem fazer com que um anticorpo se ligue a Classe II de MHC e ative uma resposta de célula T auxiliadora não desejada. Uma substituição conservadora pode permitir que o anticorpo retenha a atividade de ligação, contudo perde sua capacidade de ativar uma resposta de célula T não desejada. Também veja Steplewski e outros, Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6, incorporado aqui por referência em sua totalidade, que descreveu anticorpos quiméricos em que uma região variável de camundongo foi unida com regiões constantes gama 1, gama 2, gama 3, e gama 4 humano.

Em certas modalidades da invenção, pode ser desejável usar um fragmento de anticorpo, em lugar de um anticorpo intato. Neste caso, pode ser desejável modificar o fragmento de anticorpo para aumentar sua meia-vida de soro, por exemplo, adicionando moléculas como PEG ou outros polímeros solúveis em água, incluindo polímero de polissacarídeo, para fragmentos de anticorpo para aumentar a meia-vida. Isto também pode ser obtido, por exemplo, por incorporação de um epítopo de ligação de receptor de salvamento no fragmento de anticorpo (por exemplo, por mutação da região apropriada no fragmento de anticorpo ou incorporando-se o epítopo em um rótulo de peptídeo que é então fundido ao fragmento de anticorpo no final ou no meio, por exemplo, por síntese de DNA ou de peptídeo) (veja, por exemplo, WO96/32478).

O epítopo de ligação de receptor de salvamento preferivelmente constitui uma região em que qualquer um ou mais resíduos de aminoácido de uma ou duas alças de um domínio de Fc são transferidas para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. Ainda mais preferivelmente, três ou mais resíduos de uma ou duas alças do domínio de Fc são transferidas. Ainda mais preferido, o epítopo é tomado do domínio de CH2 da região de Fc (por exemplo, de um IgG) e transferido para região de CH1, CH3, ou VH, ou mais do que uma tal região, do anticorpo. Alternativamente, o epítopo é tomado do domínio de CH2 da região de Fc e transferido para região de C<sub>L</sub> ou região de V<sub>L</sub>, ou ambos, do fragmento de anticorpo. Também veja, os pedidos Internacionais WO 97/34631 e WO 96/32478 que descrevem as variantes de Fc e a sua interação com o receptor de salvamento.

Desse modo, os anticorpos da invenção podem compreender uma porção de Fc humano, uma porção de Fc de consenso humano, ou uma muteína dos mesmos que retém a capacidade de interagir com o receptor de salvamento de Fc, incluindo muteínas nas quais as cisteínas envolvidas em ligação de dissulfeto são modificadas ou removidas, e/ou nas quais o met encontrado é adicionado ao terminal de N e/ou um ou mais dos 20 aminoácidos de terminal de N são removidos, e/ou regiões que interagem com complemento, tal como o sítio de ligação de C1q, são removidos, e/ou o sítio

ADCC é removido [veja, por exemplo, *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 (1992)]. Os anticorpos da classe de IgG também podem incluir uma região constante diferente, por exemplo, um anticorpo de IgG2 pode ser modificado para exibir uma região constante IgG1 ou IgG4.

5                   No caso de IgG1, as modificações para a região constante, particularmente a região de CH2 ou de dobradiça, pode aumentar ou diminuir a função efetora, incluindo a atividade de ADCC e/ou CDC. Em outras modalidades, uma região constante de IgG2 é modificada para diminuir a formação de agregado de anticorpo-antígeno. No caso de IgG4, modificações para a  
10 região constante, particularmente a região de dobradiça, podem reduzir a formação de meio-anticorpos. Em modalidades exemplares específicas, a mutação da sequência de dobradiça de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys para a sequência de dobradiça IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys é fornecida.

Estudos prévios traçaram o sítio de ligação em IgG humano e de  
15 camundongo para FcR principalmente para a região de dobradiça mais baixa composta de resíduos IgG 233-239. Outros estudos propuseram segmentos amplos adicionais, por exemplo, Gly316-Lys338 para receptor I de Fc humano, Lys274-Arg301 e Tyr407-Arg416 para receptor III de Fc humano, ou encontraram alguns resíduos específicos fora da dobradiça inferior, por exemplo, Asn297 e Glu318 para IgG2b de camundongo que interage com recep-  
20 tor II de Fc de camundongo. O relato da estrutura cristalina de 3,2-Å do fragmento de Fc de IgG1 humano com receptor IIIA de Fc humano delineou resíduos de IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, e Ala327-Ile332 quando envolvido na ligação ao receptor IIIA de Fc. Foi sugerido com  
25 base na estrutura cristalina que além da dobradiça inferior (Leu234-Gly237), os resíduos em alças de domínio de CH2 de IgG FG (resíduos 326-330) e AC (resíduos 265-271) poderiam desempenhar um papel na ligação ao receptor IIA de Fc. Veja, Shields e outros, *J. Biol. Chem.*, 276(9):6591-6604 (2001), incorporados por referência aqui em sua totalidade. A mutação de  
30 resíduos em sítios de ligação de receptor de Fc pode resultar em função efetora alterada, tal como atividade de ADCC ou CDC alterada, ou meia-vida alterada. Como descrito acima, as mutações potenciais incluem inserção,

deleção ou substituição de um ou mais resíduos, incluindo substituição com alanina, uma substituição conservadora, uma substituição não conservadora, ou substituição com um resíduo de aminoácido correspondente na mesma posição de uma subclasse de IgG diferente (por exemplo, substituindo um  
 5 resíduo de IgG1 com um resíduo de IgG2 correspondente naquela posição).

Shields e outros, reportaram que os resíduos de IgG1 envolvidos na ligação a todos os receptores de Fc humanos ficam localizados no domínio de CH2 próximo a dobradiça e se incluem nas duas categorias como segue: 1) posições que podem interagir diretamente com todo o FcR incluem  
 10 Leu234-Pro238, Ala327, e Pro329 (e possivelmente Asp265); 2) posições que influenciam na natureza ou posição de carboidrato incluem Asp265 e Asn297. Os resíduos de IgG1 adicionais que afetaram a ligação ao receptor II de Fc são como segue: (efeito maior) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, e (menos efeito) His268, Asn276,  
 15 His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378, e Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A e D270A reduziram ligação. Além dos resíduos identificados acima para todo o FcR, resíduos de IgG1 adicionais que reduziram a ligação ao receptor IIIA de Fc em 40% ou mais são como segue: Ser239, Ser267 (Gly  
 20 somente), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338, e Asp376. As muteínas que melhoraram a ligação ao FcRIIIA incluem T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, e A339T. Lys414 mostrou uma redução de 40% na ligação para FcRIIA e FcRIIB, Arg416 uma redução de 30% para FcRIIA e FcRIIIA, Gln419 uma redução de 30% para FcRIIA e uma redução  
 25 de 40% para FcRIIB, e Lys360 uma melhoria de 23% para FcRIIIA. Também veja Presta e outros, *Biochem. Soc. Trans.* (2001) 30, 487–490.

Por exemplo, a Patente dos Estados Unidos N°. 6.194.551, incorporada aqui por referência em sua totalidade, descreve muteínas com a função efetora alterada contendo mutações na região de Fc de IgG humano,  
 30 na posição de aminoácido 329, 331 ou 322 (usando a numeração Kabat), alguns dos quais exibem atividade de CDC ou ligação de C1q reduzida. Como outro exemplo, a Patente dos Estados Unidos N°. 6.737.056, incorporada

aqui por referência em sua totalidade, descrevem muteínas com ligação de Fc-gama-receptora ou efetora alterada contendo mutações na região de Fc de IgG humano, na posição de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439 (usando numeração de Kabat), alguns dos quais exibem perfis de ligação de receptor associados com atividade de ADCC ou CDC reduzida. Destes, uma mutação na posição de aminoácido 238, 265, 269, 270, é iniciada para reduzir a ligação a FcRI 327 ou 329, uma mutação na posição de aminoácido 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ou 439 é iniciada para reduzir a ligação a FcRII, e uma mutação na posição de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ou 437 é iniciada para reduzir a ligação a FcRIII.

A Patente dos Estados Unidos N°. 5.624.821, incorporada aqui por referência em sua totalidade, relata que a atividade de ligação de Clq de um anticorpo de camundongo pode ser alterada mutando-se o resíduo de aminoácido 318, 320 ou 322 da cadeia pesada e que a substituição do resíduo 297 (Asn) resulta na remoção da atividade lítica.

Publicação de Pedido dos Estados Unidos No. 20040132101, incorporada aqui por referência em sua totalidade, descreve as muteínas com mutações nas posições de aminoácido 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328, ou 332 (usando numeração de Kabat) ou posições 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, ou 332 (usando numeração de Kabat), das quais as mutações nas posições 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, ou 332 podem reduzir a atividade de ADCC ou reduzir a ligação a um receptor de gama Fc.

Chappel e outros, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(20):9036-40, incorporado aqui por referência em sua totalidade, relata que a atividade citofílica de IgG1 é uma propriedade intrínseca de seu domínio de CH2 de cadeia pesada. As mutações de ponto único em qualquer dos resíduos de aminoácido 234-237 de IgG1 significativamente reduziram ou aboliram sua atividade. A substituição de todos os resíduos de IgG1 234-237 (LLGG) em IgG2 e IgG4 foram requeridos para restabelecer a atividade de ligação completa. Um anticorpo de IgG2 que contém a sequência de ELLGGP inteira (resíduos 233-238) foi observado ser mais ativo do que IgG1 tipo selvagem.

Isaacs e outros, J Immunol. 1998;161(8):3862-9, incorporados aqui por referência em sua totalidade, relata que as mutações em um motivo crítico para ligação de gammaR de Fc (glutamato 233 para prolina, leucina/fenilalanina 234 para valina, e leucina 235 para alanina) completamente preveniu a depleção de células alvos. O glutamato de mutação 318 para alanina eliminou a função efetora de rato IgG2b e também reduziu a potência de IgG4 humano.

Armour e outros, Mol Immunol. 2003;40(9):585-93, incorporados aqui por referência em sua totalidade, identificaram muteínas de IgG1 que reagem com o receptor de ativação, FcgammaRIIa, pelo menos 10 vezes menos eficazmente do que IgG1 do tipo selvagem porém cuja ligação ao receptor inibidor, FcgammaRIIb, é somente quatro vezes reduzido. As mutações foram feitas na região de aminoácidos 233-236 e/ou nas posições de aminoácido 327, 330 e 331. Também veja WO 99/58572, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Xu e outros, J Biol Chem. 1994;269(5):3469-74, incorporados aqui por referência em sua totalidade, relata que a mutação de IgG1 Pro331 para Ser notadamente a diminuiu a ligação de C1q e virtualmente eliminou a atividade lítica. Em contraste, a substituição de Pro por Ser331 em IgG4 deu atividade lítica parcial (40%) para a muteína de Pro331 de IgG4.

Schuurman e outros Mol Immunol. 2001;38(1):1-8, incorporados aqui por referência em sua totalidade, relata que a mutação de uma das cisteínas de dobradiça envolvida na formação de ligação de cadeia inter-

pesada, Cys226, para serina resultou em uma ligação de cadeia interpesado mais estável. A mutação da sequência de dobradiça de IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys para a sequência de dobradiça de IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys também notadamente estabiliza a interação covalente entre as cadeias pesadas.

5           Angal e outros, *Mol Immunol.* 1993;30(1):105-8, incorporados aqui por referência em sua totalidade, relata que a mutação da serina na posição de aminoácido 241 em IgG4 para prolina (encontrado naquela posição em IgG1 e IgG2) levou à produção de um anticorpo homogêneo, bem como prolongando a meia-vida de soro e melhorando a distribuição de tecido comparado com o IgG4 original quimérico.

10           A invenção também contempla a produção de moléculas de anticorpo com estrutura de carboidrato alterada que resulta em atividade efetora alterada, incluindo moléculas de anticorpo com fucosilação ausente ou reduzida que exibe atividade de ADCC melhorada. Uma variedade de modos  
15           é conhecida na técnica para realizar isto. Por exemplo, a atividade efetora de ADCC é mediada ligando-se a molécula de anticorpo ao receptor de FcγRIII, que foi mostrada ser dependente da estrutura de carboidrato da glicosilação ligada a N no Asn-297 do domínio de CH2. Os anticorpos não fucosilados ligam este receptor com afinidade aumentada e ativam funções efectoras me-  
20           diadas por FcγRIII mais eficazmente do que anticorpos nativos, fucosilados. Por exemplo, a produção recombinante de anticorpo não fucosilado em células CHO nas quais a enzima de alfa-1,6-fucosila transferase foi nocauteada resulta em anticorpo com atividade de ADCC 100 vezes aumentada [Yama-  
25           ne-Ohnuki e outros, *Biotechnol Bioeng.* 2004 Sep 5;87(5):614-22]. Efeitos semelhantes podem ser realizados por diminuição da atividade desta ou outras enzimas na série de reações de fucosilação, por exemplo, por tratamento de RNA de antissentido ou siRNA, criando-se linhagens de célula para nocautear a enzima(s), ou cultivando-se com inibidores de glicosilação sele-  
30           tivos [Rothman e outros, *Mol Immunol.* 1989 Dec;26(12):1113-23]. Algumas cepas de célula hospedeira, por exemplo, linhagem de célula YB2/0 de hibridoma de rato ou Lec13 naturalmente produzem anticorpos com níveis de fucosilação mais baixos. Shields, e outros, *J Biol Chem.* 2002 Jul

26;277(30):26733-40; Shinkawa e outros, J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73. Um aumento no nível de carboidrato bifurcado, por exemplo, por recombinantemente produção de anticorpo em células que superexpressam a enzima de GnTIII, também foi determinado para aumentar a atividade de ADCC. Umana e outros, Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80. Foi predito que a ausência de somente um dos dois resíduos de fucose pode ser suficiente para aumentar a atividade de ADCC. [Ferrara e outros, J Biol Chem. 2005 5 de Dec]

#### Outras modificações covalentes

10 As modificações covalentes do anticorpo também são incluídas dentro do escopo desta invenção. Elas podem ser feitas através de síntese química ou por clivagem enzimática ou química do anticorpo, se aplicável. Outros tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidos na molécula reagindo-se os resíduos de aminoácido alvos do anticorpo com um  
15 agente de derivação orgânico que é capaz de reagir com correntes laterais selecionadas ou os N resíduos de terminal de C.

Os resíduos de cisteinila mais geralmente são reagidos com  $\alpha$ -haloacetatos (e aminas correspondentes), tal como ácido cloroacético ou cloroacetamida, para produzir carboximetila ou derivados de carboxiamido-  
20 metila. Os resíduos de cisteinila também são derivados através de reação com bromotrifluoroacetona, ácido.alfa.-bromo- $\beta$ -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetila, dissulfeto de N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridila, dissulfeto de 2-piridila de metila, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, ou cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

25 Os resíduos de histidila são derivados por reação com dietilpirocarbonato em pH 5,5-7,0 porque este agente é relativamente específico para a cadeia lateral de histidila. O brometo de para-bromofenacila também é útil; a reação é preferivelmente realizada em 0,1 M de cacodilato de sódio a pH 6,0.

30 Os resíduos de lisinila e terminais de amino são reagidos com ácido sucínico ou outros ácidos de anidrido carboxílicos. A derivação com estes agentes tem o efeito de inverter a carga dos resíduos de lisinila. Ou-

tros reagentes adequados para derivação de resíduos contendo .alfa.-amino incluem imidoésteres tal como picolinimidato de metila, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroboroidreto, ácido trinitrobenzenossulfônico, O-metilisouréia, 2,4-pentanodiona, e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

5 Os resíduos de arginila são modificados através de reação com um ou vários reagentes convencionais, entre eles fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-cicloexanodiona, e ninidrina. A derivação de resíduos de arginina requer que a reação seja realizada em condições alcalinas por causa do  $pK_a$  elevado do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes  
10 tes podem reagir com os grupos de lisina como também o grupo de epsilon-amino arginina.

A modificação específica de resíduos de tirosila pode ser feita, com interesse particular de introduzir rótulos espectrais em resíduos de tirosila através de reação com combinações de diazônio aromáticas ou tetranitrometano. Geralmente, N-acetilimidizol e tetranitrometano são usados para  
15 formar espécies de tirosila de O-acetila e derivados de 3-nitro, respectivamente. Os resíduos de tirosila são iodadas usando  $^{125}I$  ou  $^{131}I$  para preparar proteínas rotuladas para uso em radioimunoensaio.

Os grupos laterais de carboxila (aspartila ou glutamila) são seletivamente modificados por reação com carbodiimidas ( $R-N.dbd.C.dbd.N-R$ ), onde R e R' são grupos alquila diferentes, tal como 1-cicloexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Além disso, os resíduos de aspartila e glutamila são convertidos para resíduos de asparaginila e glutaminila através de reação com íons de amônio.  
20

25 Os resíduos de glutaminila e asparaginila freqüentemente são desamidados pelos resíduos de glutamila e aspartila correspondentes, respectivamente. Estes resíduos são desamidados sob condições neutras ou básicas. A forma desamidada destes resíduos se inclui o escopo desta invenção.

30 Outras modificações incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de serila ou treonila, metilação dos grupos .alfa.-amino de cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina (T. E.

Creighton, Protein: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., São Francisco, pp. 79-86 (1983)), a acetilação da amina de terminal de N, e amidação de qualquer grupo carboxila de terminal de C.

Outro tipo de modificação covalente envolve quimicamente ou  
5 enzimaticamente acoplar glicosídeos ao anticorpo. Estes procedimentos são vantajosos pelo fato de que não requerem produção do anticorpo em uma célula hospedeira que tenha capacidades de glicosilação para glicosilação N- ou O-ligada. Dependendo do modo de acoplamento usado, o açúcar(s) pode ser preso (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxila livre, (c) grupos  
10 sulfidrilas livres como aqueles de cisteína, (d) grupos hidroxila livres como aqueles de serina, treonina, ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos como aqueles de fenilalanina, tirosina, ou triptofano, ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos são descritos em WO87/05330 publicado em 11 de Sep. 1987, e em Aplin e Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306  
15 (1981).

A remoção de quaisquer porções de carboidrato presente no anticorpo pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente. A deglicosilação química requer a exposição do anticorpo ao ácido trifluorometanossulfônico de composto, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta  
20 na clivagem da maioria ou todos os açúcares exceto o açúcar de ligação (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina), ao mesmo tempo em que deixando o anticorpo intato. A deglicosilação química é descrita por Hakimuddin, e outros Arco. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) e por Edge e outros, Anal. Biochem., 118: 131 (1981). A clivagem enzimática de porções de carboidrato em anticorpos pode ser alcançada pelo uso de uma variedade de  
25 endo - e exo-glicosidases como descrito por Thotakura e outros Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente do anticorpo compreende a ligação do anticorpo a um de uma variedade de polímero não proteináceo,  
30 por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polióis polioxietilados, sorbitol polioxietilados, glicose polioxietilada, glicerol polioxietilada, polioxiálquilenos, ou polímero de polissacarídeo tal como dextrana. Tais métodos

são conhecidos na técnica, veja, por exemplo, Patentes US N<sup>os</sup>. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192. 4.179.337. 4.766.106. 4.179.337. 4.495.285. 4.609.546 ou EP 315 456.

Cada molécula de anticorpo pode ser presa a uma ou mais (ist  
 5 é, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais) moléculas de polímero. As moléculas de polímero são preferivelmente presas aos anticorpos através de moléculas ligadoras. O polímero pode, em geral, ser um polímero sintético ou de ocorrência natural, por exemplo, uma cadeia de polialceno opcionalmente substituído linear ou ramificada, polímero de polialcenileno ou polioxialquilenos ou um polissacarídeo ramificado ou não ramificado, por exemplo, homo- ou heteropolissacarídeo. Os polímeros preferidos são polióis de polioxietileno e polietileno glicol (PEG). PEG é solúvel em água em temperatura ambiente e tem a fórmula geral:  $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$  onde R pode ser hidrogênio, ou um grupo protetor tal como um grupo alquila ou alcanol. Preferivelmente, o grupo protetor tem entre 1 e 8 carbonos, mais preferivelmente é metila. O símbolo n é um número inteiro positivo, preferivelmente entre 1 e 1,000, mais preferivelmente entre 2 e 500. A PEG tem um peso molecular médio preferido entre 1000 e 40.000, mais preferivelmente entre 2000 e 20.000, preferivelmente entre 3.000 e 12.000. Preferivelmente, PEG tem pelo menos um grupo hidróxi, mais preferivelmente é um grupo hidróxi terminal. É este grupo hidróxi é preferivelmente ativado para reagir com um grupo amino livre no inibidor. Porém, será entendido que o tipo e quantidade dos grupos reativos possam ser variados para alcançar um PEG covalentemente conjugado/anticorpo da invenção presente. Os polímeros preferidos, e métodos para os prender aos peptídeos, são mostrados nas Pat. U. S. N<sup>os</sup>. 4.766. 106; 4.179. 337; 4.495. 285; e 4.609. 546 que são todos desse modo incorporados por referência em sua totalidade.

#### Terapia de Gene

A liberação de um anticorpo terapêutico para células apropriadas  
 30 pode ser efetuada por terapia de gene *ex vivo*, *in situ*, ou *in vivo* por uso de qualquer abordagem adequada conhecida na técnica, incluindo por uso de métodos de transferência de DNA físicos (por exemplo, lipossomas ou tra-

tamentos químicos) ou por uso de vetores virais (por exemplo, adenovirus, vírus adeno-associado, ou um retrovírus). Por exemplo, para terapia *in vivo*, um ácido nucléico que codifica o anticorpo desejado, ou sozinho ou junto com um vetor, lipossoma, ou precipitado pode ser injetado diretamente no

5 paciente, e em algumas modalidades, pode ser injetado no sítio onde a expressão da combinação de anticorpo é desejada. Para tratamento *ex vivo*, as células do paciente são removidas, o ácido nucléico é introduzido nestas células, e as células modificadas ou são devolvidas diretamente ao paciente ou, por exemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que são im-

10 plantadas no paciente. Veja, por exemplo, Pat. USA N<sup>os</sup>. 4.892.538 e 5.283.187. Há uma variedade de técnicas disponíveis para introduzir ácidos nucléicos em células viáveis. As técnicas variam, dependendo se o ácido nucléico é transferido em células cultivadas *in vitro*, ou *in vivo* nas células do hospedeiro pretendido. As técnicas adequadas para a transferência de ácido

15 nucléico em células de mamífero *in vitro* incluem o uso de lipossomas, eletroporação, microinjeção, fusão de célula, DEAE-dextrana, e precipitação de fosfato de cálcio. Um vetor geralmente usado para liberação *ex vivo* de um ácido nucléico é um retrovírus.

Outras técnicas de transferência de ácido nucléico *in vivo* inclu-

20 em transfecção com vetores virais (tal como adenovírus, vírus do Herpes simples I, ou vírus adeno-associado) e sistemas com base em lipídeos. O ácido nucléico e agente de transfecção são opcionalmente associados com uma micropartícula. Os agentes de transfecção exemplares incluem co-

25 precipitação de fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrana, DOTMA anfifila de amônio quaternário ((dioleoiloxipropi- la) brometo de trimetilamônio, comercializado como Lipofectin por GIBCO-BRL)) (Felgner e outros, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 84, 7413-7417; Malone e outros (1989) Proc. Natl Acad. Sci. E.U.A. 86 6077-6081); diésteres de glutamato lipofílico com cabeças de trimetilamônio pendent

30 es (Ito e outros (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); os lipídios origem metabolizáveis tal como a glicilespermina de dioctadecilamido de lipídio catiônico (DOGS, Transfectam, Promega) e etanolamilespermina de dipalmitoilfos-

fatidila (DPPES)(J. P. Behr (1986) *Tetrahedron Lett.* 27, 5861-5864; J. P. Behr e outros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 86, 6982-6986); sal de amônio quaternário metabolizável (DOTB, metilsulfato de N-(1-[2,3-dioleoiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP)(Boehringer Mannheim),  
5 polietilenoimina (PEI), ésteres de dioleoíla, ChoTB, ChoSC, DOSC) (Leventis e outros (1990) *Biochim. Enterre.* 22, 235-241); 3beta[N-(N', N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Chol), etanolamina de dioleoil-fosfatidila (DOPE)/3beta[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterolDC-Chol em misturas de um para um (Gao e outros,  
10 (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065, 8-14), espermina, espermidina, lipopoliaminas (Behr e outros, *Bioconjugate Chem*, 1994, 5: 382-389), polilisinas lipofílicas (LPLL) (Zhou e outros, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), hidróxido de [(1,1,3,3-tetrametilbutil)cre-soxi] etóxi]etil] dimetilbenzilamônio (hidróxido de DEBDA) com fosfatidilcolina/colesterol em excesso (Ballas e  
15 outros, (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), brometo de cetiltrimetilamônio (misturas de CTAB)/DOPE (Pinnaduwege e outros, (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 985, 33-37), diésteres lipofílicos de ácido glutâmico (TMAG) com DOPE, CTAB, DEBDA, brometo de didodecilamônio (DDAB), e estearilamina em mistura com fosfatidiletanolamina (Rose e outros, (1991) *Biotechnology* 10, 520-525), DDAB/DOPE (TransfectACE, GIBCO BRL), e lipídios de  
20 suporte de oligogalactose. Os agentes realçadores de transfecção exemplares que aumentam a eficiência de transferência incluem, por exemplo, DEAE-dextrana, polibreno, peptídeo disruptivo de lisossoma (Ohmori N I e outros, *Biochem Biophys Res Commun Jun.* 27, 1997;235(3):726-9), proteoglicanos com base em condroitano, proteoglicanos sulfatados, polietilenimina, polilisina (Pollard H e outros *J Biol Chem*, 1998 273 (13):7507-11), CYG-GRGDTP de peptídeo de ligação de integrina, nonassacarídeo de dextrana linear, glicerol, grupos de colesterila presos na ligação de internucleosídeo de terminal de 3 de um oligonucleotídeo (Letsinger, R., L. 1989 *Proc Natl Acad Sci E.U.A.* 86: (17):6553-6), lisofosfatídeo, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, e lisofosfatidilcolina de 1-oleoíla.

Em algumas situações pode ser desejável para liberar ácido nu-

cléico com um agente que direciona o vetor contendo ácido nucléico para alvejar as células. Tais moléculas "alvejantes" incluem anticorpos específicos para uma proteína de membrana de superfície célula na célula alvo, ou um ligando para um receptor na célula alvo. Onde os lipossomas são empregados, as proteínas que se ligam a uma proteína de membrana de superfície de célula associadas com endocitose podem ser usadas para alvejar e/ou para facilitar a absorção. Os exemplos de tais proteínas incluem proteínas de capsídeo e fragmentos destes trópicos para um tipo de célula particular, anticorpos para proteínas que sofrem internalização em ciclagem, e proteínas que alvejam a localização intracelular e aumentam a meia-vida intracelular. Em outras modalidades, a endocitose mediada por receptor pode ser usada. Tais métodos são descritos, por exemplo, em Wu e outros, 1987 ou Wagner e outros, 1990. Para revisão dos protocolos de terapia de gene e marcação de gene atualmente conhecidos, veja Anderson 1992. Também veja WO 93/25673 e as referências citadas aqui. Para revisões adicionais de tecnologia de terapia de gene, veja Friedmann, *Science*, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, *Nature*, suplemento ao vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, *Scientific American*: 68-84 (1990); e Miller, *Nature*, 357: 455-460 (1992).

## 20 Métodos de avaliação

Outro aspecto da presente invenção está voltado aos métodos para identificar anticorpos que diminuem a atividade de um EphB3 compreendendo contatar um EphB3 com um anticorpo, e determinar se o anticorpo modifica atividade do EphB3. A atividade na presença do anticorpo de teste é comparada à atividade na ausência do anticorpo de teste. Onde a atividade da amostra que contém o anticorpo de teste é mais baixa do que a atividade na amostra que falta o anticorpo de teste, o anticorpo terá atividade inativa ou diminuída. Os terapêuticos efetivos dependem de identificar os agentes eficazes destituídos de toxicidade significativa. Os anticorpos podem ser avaliados quanto à afinidade de ligação por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os ensaios de troca de gel, manchas do Ocidente, ensaio de competição radiorrotulada, co-fracionamento através de cromatografia,

co-precipitação, reticulação, ELISA, e outros podem ser usados, os quais são descritos em, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (1999) John Wiley & Sons, NY que está aqui incorporado através de referência em sua totalidade.

- 5                    Para inicialmente avaliar quanto aos anticorpos que se ligam ao epítipo desejado no antígeno alvo, um ensaio de **cross-blocking** rotineiro tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), pode ser realizado. Ensaio de ligação competitivos rotineiros também podem ser usados nos
- 10                    quais o anticorpo desconhecido é caracterizado por sua capacidade de inibir a ligação do alvo a um anticorpo de alvo específico da invenção. O antígeno intato, fragmento do mesmo, tal como o domínio extracelular, ou epítopos lineares podem ser usados. O traçado de epítipo é descrito em Champe e outros, *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394 (1995).
- 15                    Em uma variação de um ensaio de ligação *in vitro*, a invenção fornece um método que compreende as etapas de (a) contatar um EphB3 imobilizado com um anticorpo candidato e (b) ligar o detector do anticorpo candidato ao EphB3. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo candidato é imobilizado e a ligação de EphB3 é detectada. A imobilização é realizada
- 20                    usando quaisquer dos métodos bem conhecido na técnica, incluindo ligação covalente a um suporte apoio, uma conta, ou uma resina cromatográfica, como também interação de alta afinidade, não covalente, tal como ligação de anticorpo, ou uso de ligação de estreptavidina/biotina em que os compostos imobilizados incluem uma porção de biotina. A detecção da ligação pode
- 25                    ser realizada (i) usando um rótulo radioativo no composto que não está imobilizado, (ii) usando um rótulo fluorescente no composto não imobilizado, (iii) usando um anticorpo imuno específico para o composto não imobilizado, (iv) usando um rótulo no composto não imobilizada que excita um suporte fluorescente ao qual o composto imobilizado é preso, como também outras técnicas bem conhecidas e habitualmente praticadas na técnica.
- 30

Os anticorpos que diminuem a atividade do antígeno alvo podem ser identificados incubando um anticorpo candidato com antígeno alvo (ou

uma célula que expresse o antígeno designado) e determinando o efeito do anticorpo candidato na atividade ou expressão do antígeno alvo. A atividade na presença do anticorpo de teste é comparada à atividade na ausência do anticorpo de teste. Onde a atividade da amostra que contém o anticorpo de teste é mais baixa do que a atividade na amostra que falta o anticorpo de teste, o anticorpo terá atividade diminuída. A seletividade de um anticorpo que modula a atividade de um polinucleotídeo ou polipeptídeo de antígeno alvo pode ser avaliada comparando seus efeitos no antígeno alvo com seu efeito em outros compostos relacionados.

Em modalidades exemplares particulares, é contemplado que os anticorpos são testados quanto ao seu efeito em um sistema de célula cultivada para determinar sua capacidade de inibir a fosforilação de receptor, sinalização, ligação de ligando, dimerização de EphB3, ativação de receptor induzida por ligando, e/ou adesão de célula-célula mediada por EphB3. Adicionalmente, ensaios celulares incluindo ensaios de proliferação, ensaios de agar macia, e/ou ensaios de citotoxicidade como descrito aqui podem ser usado para avaliar um anticorpo de EphB3 particular.

A atividade biológica de um anticorpo particular, ou combinação de anticorpos, pode ser avaliada *in vivo* usando um modelo de animal adequado. Por exemplo, a transfecção da espinha dorsal de rato adulto e monitoramento da super-regulação de EphB3 e expressão de ligando são contemplados. (Cell Transplant. 2003;12(3):279-90).

A invenção também compreende os ensaios de avaliação de alta produtividade (HTS) para identificar anticorpos que interagem com ou inibem a atividade biológica (isto é, inibem a fosforilação, dimerização, ativação induzida por receptor de ligando, ou sinalização intracelular, etc.) de antígeno alvo. Os ensaios de HTS permitem a avaliação de números grandes de compostos de uma maneira eficiente. Os sistemas de HTS com base em célula são contemplados para investigar a interação entre o antígeno alvo e seus membros de ligação. Os ensaios de HTS são designados para identificar "hits" ou "compostos indutores" tendo a propriedade desejada da qual, modificações podem ser projetadas para melhorar a propriedade desejada.

Em outra incorporação da invenção, a avaliação de alta produtividade para fragmentos de anticorpo ou CDRs com 1, 2, 3 ou mais modificações para aminoácidos nos CDRs tendo afinidade de ligação adequada a um polipeptídeo de antígeno alvo é empregada.

#### 5 Terapia de combinação

Tendo identificado mais de um anticorpo que é efetivo em um modelo animal, pode ser também vantajoso misturar dois ou mais tais anticorpos juntos (que se ligam aos mesmos ou diferentes antígenos alvos) para fornecer eficácia ainda melhorada. As composições que compreendem um ou mais anticorpos podem ser administradas a pessoas ou mamíferos que sofrem, ou estão predispostos a sofrer, uma doença ou distúrbio relacionado com EphB3. A administração simultânea de dois agentes terapêuticos não requer que os agentes sejam administrados ao mesmo tempo ou pela mesma rotina, contanto que haja uma sobreposição no período de tempo durante o qual os agentes estão mostrando seu efeito terapêutico. A administração simultânea ou seqüente é contemplada, quando é administração em dias ou semanas diferentes.

Os métodos da invenção contemplam a administração de únicos anticorpos, como também combinações, ou "coquetéis", de anticorpos diferentes. Tais coquetéis de anticorpo podem ter certas vantagens já que eles contêm anticorpos que exploram mecanismos efetores diferentes ou combinam anticorpos citotóxicos diretamente com anticorpos que confiam na funcionalidade efetora imune. Tais anticorpos em combinação podem exibir efeitos terapêuticos sinérgicos.

Os métodos da invenção também contemplam a administração de anticorpos únicos ou coquetéis de anticorpo em combinação com o padrão medicinalmente reconhecido de cuidado para a doença ou distúrbio particular sendo tratado.

Um agente citotóxico se refere a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa destruição de células. O termo é pretendido incluir isótopos radioativos (por exemplo,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  e  $Re^{186}$ ), agentes quimioterapêuticos, e toxinas tal como toxinas enzimaticamente ativas de

origem bacteriana, fúngica, de planta ou animal ou toxinas sintéticas, ou fragmentos da mesma. Um agente não citotóxico se refere a uma substância que não inibe ou previne a função de células e/ou não cause destruição de células. Um agente não citotóxico pode incluir um agente que pode ser ativado para ser citotóxico. Um agente não citotóxico pode incluir uma conta, lipossoma, matriz ou partícula (veja, por exemplo, Publicações de Patentes dos Estados Unidos 2003/0028071 e 2003/0032995 que estão incorporadas aqui por referência). Tais agentes podem ser conjugados, acoplados, ligados ou associados com um anticorpo de acordo com a invenção.

#### 10 Administração e preparação

Os anticorpos da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas que compreendem um portador adequado para o método de liberação desejado. Os portadores adequados incluem qualquer material que, quando combinado com anticorpos, retém a atividade desejada do anticorpo e é não reativo com os sistemas imunes do paciente. Os exemplos incluem, porém não estão limitados a, quaisquer dos vários portadores farmacêuticos padrões tal como soluções salinas tamponadas de fosfato estéreis, água bacteriostática, e similares. Uma variedade de portadores aquosos pode ser usada, por exemplo, água, água tamponada, 0,4% de salina, 0,3% de glicina e similares, e pode incluir outras proteínas para estabilidade aumentada, tal como albumina, lipoproteína, globulina, etc., submetida a modificações químicas moderadas ou similares.

As formulações terapêuticas do anticorpo são preparadas para armazenamento misturando-se o anticorpo tendo o grau desejado de pureza com portadores, excipientes ou estabilizadores fisiologicamente aceitáveis opcionais, (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A., Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os portadores, excipientes, ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos aos recipientes nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; os antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; preservativos (como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzila; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto

de benzetônio; fenol, butila ou álcool de benzila; parabenos de alquila tal como metila ou parabeno de propila; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo (menos de aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tal 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; os agentes de quelação tal como EDTA; açúcares tal como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, Complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

A formulação neste aspecto pode conter também mais de um composto ativo quando necessário para a indicação particular que é tratada, preferivelmente aquelas com atividades complementares que não afetam um ao outro adversamente. Tais moléculas estão apropriadamente presentes nos composto em quantidades que são efetivas para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos também podem estar em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsula de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de liberação de fármaco coloidal (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A., Ed. (1980).

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado através de filtração por membranas de filtração estéreis.

O anticorpo é administrado por qualquer meio adequado, incluindo parenteral, subcutâneo, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, e, se desejou para tratamento local, administração intralesional. As infusões parenterais incluem administração intravenosa, intraarterial, intraperitoneal,

intramuscular, intradérmica ou subcutânea. Além disso, o anticorpo é administrado adequadamente por infusão de pulso, particularmente com doses decrescente do anticorpo. Preferivelmente a dosagem é determinada por injeções, preferivelmente injeções intravenosas ou subcutâneas. Outros métodos de administração são contemplados, incluindo administração tópica, particularmente transdérmica, transmucosal, retal, oral ou local, por exemplo, por um cateter colocado perto do sítio desejado.

Para administração nasal, as formulações farmacêuticas e medicamentos podem ser um *spray* ou aerossol que contém um solvente(s) apropriado e opcionalmente outros compostos tais como, porém não limitado a, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores de pH, tensoativos, modificadores de biodisponibilidade e combinações destes. Um propulsor para uma formulação aerossol pode incluir ar comprimido, nitrogênio, gás carbônico, ou um solvente de baixa ebulição com base em hidrocarboneto.

As formas de dosagem injetáveis geralmente incluem suspensões aquosas ou suspensões de óleo que podem ser preparadas usando um dispersante adequado ou agente umectante e um agente de suspensão. As formas injetáveis podem estar em fase de solução ou na forma de uma suspensão que é preparada com um solvente ou diluente. Os solventes ou veículos aceitáveis incluem água esterilizada, a solução de Ringer, ou uma solução salina aquosa isotônica.

Para injeção, a formulação farmacêutica e/ou medicamento podem ser um pó adequado para reconstituição com uma solução apropriada para injeção, como descrito acima. Os exemplos destes incluem, porém não estão limitados a, liofilização, pós secos a giro ou secos por *spray*, pós amorfos, grânulos, precipitados, ou particulados. Para injeção, as formulações podem opcionalmente conter estabilizadores, modificadores de pH, tensoativos, modificadores de biodisponibilidade e combinações destes.

As preparações liberação contínua podem ser preparadas. Os exemplos adequados de preparações de liberação contínua incluem matrizes semipermeáveis de polímero hidrofóbicos sólidos que contêm o anticor-

po, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, por exemplo, películas, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação contínua incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (Patente U.S. N°. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e y etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinila não degradável, copolímeros de ácido láctico- ácido glicólico degradáveis como Lupron Depot™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico - ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D - (-) -3-hidroxibutírico. Ao mesmo tempo em que os polímeros tal como acetato de etileno-vinila e ácido láctico - ácido glicólico permitem a liberação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem por muito tempo no corpo, eles podem desnaturar ou podem se agregar como resultado de exposição a umidade em 37°C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser inventadas para estabilização que depende do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é descoberto ser a formação de ligação de S--S intermolecular por permuta de tio-dissulfeto, a estabilização pode ser obtida modificando-se os resíduos de sulfidrina, liofilizando as soluções ácidas, controlando o teor de umidade, usando aditivos apropriados, e desenvolvendo composições de matriz de polímero específicas. Outras estratégias conhecidas na técnica podem ser usadas.

As formulações da invenção podem ser designadas serem de curta ação, rápida liberação, longa ação, ou liberação contínua como descrito aqui. Desse modo, as formulações farmacêuticas também podem ser formuladas para liberação controlada ou para liberação lenta.

As presentes composições também podem compreender, por exemplo, micelas ou lipossomas, ou alguma outra forma encapsulada, ou podem ser administradas em uma forma de liberação prolongada para fornecer um efeito de armazenamento e/ou liberação prolongado. Então, as formulações e medicamentos farmacêuticos podem ser prensados em pelotas ou cilindros e implantadas intramuscularmente ou subcutaneamente co-

mo injeções de depósito ou como implantes tal como *stents*. Tais implantes podem empregar materiais inertes conhecidos tais como silicones e polímeros biodegradáveis.

5 Além dessas formas de dosagem representativas descritas acima, os excipientes e veículos farmacologicamente aceitáveis geralmente são conhecidos por aqueles versados na técnica e são desse modo incluídos na presente invenção. Tais excipientes e portadores são descritos, por exemplo, em "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991) que está aqui incorporado através de referência.

10 Dosagens específicas podem ser ajustadas dependendo das condições de doença, da idade, peso corpóreo, condições de saúde gerais, genótipo, sexo, e dieta do paciente, intervalos de dose, rotinas de administração, taxa de excreção, e combinações de fármacos. Quaisquer das formas de dosagem acima que contêm quantidades efetivas está bem dentro  
15 dos limites de experimentação rotineira e então, bem dentro do escopo da presente invenção.

Os anticorpos da invenção geralmente serão preparados substancialmente livres de outras imunoglobulinas ou outras moléculas biológicas de ocorrência natural. Os anticorpos preferidos também exibirão toxicidade mínima quando administrados a um mamífero afligido com, ou predisposto a sofrer de uma doença ou distúrbio relacionado com EphB3.  
20

As composições da invenção podem ser esterilizadas através de técnicas de esterilização convencionais, bem conhecidas. As soluções resultantes podem ser embaladas para uso ou podem ser filtradas sob condições assépticas e liofilizadas, a preparação liofilizada sendo combinada com uma  
25 solução estéril antes da administração. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacologicamente aceitáveis quando requerido para se aproximar das condições fisiológicas, tal como agentes de ajuste de pH e agentes de proteção, agentes de ajuste de tonicidade e similares, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio,  
30 cloreto de cálcio e estabilizadores (por exemplo, 1 20% de maltose, etc.).

Os anticorpos da presente invenção também podem ser admi-

nistrados por lipossomas que são vesículas pequenas compostas de vários tipos de lipídios e/ou fosfolipídeos e/ou tensoativos que sejam úteis para liberação de um fármaco (tal como os anticorpos descritos aqui e, opcionalmente, agente quimioterapêutico). Lipossomas incluem emulsões, espumas, micelas, monocamadas insolúveis, dispersões de fosfolipídeos, camadas lamelares e similares, e podem servir como veículos para alvejar os anticorpos para um tecido particular como também aumentar a meia vida da composição. Uma variedade de métodos está disponível para preparar lipossomas, como descrito em, por exemplo, Patente dos Estados Unidos N<sup>o</sup>. 4.837.028 e 5.019.369 cujas patentes estão aqui incorporadas através de referência.

Lipossomas que contêm o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, como descrito em Epstein e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 82: 3688 (1985); Hwang e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 77: 4030 (1980); e Patentes dos Estados Unidos EUA N<sup>os</sup>. 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomas com tempo de circulação aumentado são descritos na Patente dos Estados Unidos N<sup>o</sup>. 5.013.556. Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídio que compreende fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina derivado de colesterol e PEG (PEG-PE). Lipossomas são extrusados por filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos de Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados para os lipossomas como descrito em Martin e outros, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) por uma reação de permuta de dissulfeto. O agente quimioterapêutico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente contido dentro do lipossoma [veja, por exemplo, Gabizon e outros, J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989)].

A concentração de anticorpo nestas composições pode variar amplamente, isto é, de menos que cerca de 10%, normalmente pelo menos cerca de 25% para tanto quanto 75% ou 90% em peso e será selecionada principalmente por volumes fluidos, viscosidades, etc., de acordo com um modo particular de administração selecionado. Os métodos atuais para pre-

parar composições oralmente, topicamente e parenteralmente administráveis serão conhecidos ou evidentes para aqueles versados na técnica e são descritos em detalhes em, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 19º ed., Mack Publishing Cia., Easton, PA (1995) que está aqui incorporado por referência.

A determinação de uma quantidade efetiva de uma composição da invenção para tratar doença em um paciente pode ser realizada por métodos empíricos padrões que são bem conhecido na técnica. Uma quantidade adequada para realizar isto é definida como uma "dose terapeuticamente efetiva". As quantidades efetivas de um anticorpo variarão e dependerão da severidade da doença e do peso e estado geral do paciente sendo tratado, mas geralmente varia de cerca de 1,0 µg/kg a cerca de 100 mg/kg de peso corpóreo. As doses exemplares podem variar de cerca de 10 µg/kg a cerca de 30 mg/kg, ou de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg ou de cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg por aplicação. O anticorpo também pode ser dosado através de área de superfície de corpo (por exemplo, até 4,5 g/ metro quadrado). Outras doses exemplares de anticorpo incluem até 8g total em uma única administração (assumindo um peso corpóreo de 80 kg ou área de superfície de corpo de 1,8 metros quadrados).

A administração pode ser por qualquer meio conhecido na técnica. Por exemplo, o anticorpo pode ser administrado por uma ou mais administrações de bolo separado, ou por infusão curta ou longa durante um período de, por exemplo, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutos ou mais. Seguente um período de tratamento inicial, e dependendo da resposta do paciente e tolerância da terapia, doses de manutenção podem ser administradas, por exemplo, semanalmente, quinzenalmente, a cada 3 semanas, a cada 4 semanas, mensalmente, bimestralmente, a cada 3 meses, ou a cada 6 meses, quando necessário para manter a resposta do paciente. Dosagens mais frequentes podem ser necessárias até que uma supressão desejada de sintomas de doença ocorra, e as dosagens podem ser ajustadas quando necessário. O progresso desta terapia é monitorado facilmente por técnicas e ensaios convencionais. A terapia pode ser durante um período definido ou po-

de ser crônica e pode continuar durante um período de anos até a progressão da doença ou morte.

As administrações únicas ou múltiplas das composições podem ser realizadas com os níveis de dose e padrão sendo selecionados pelo médico do tratamento. Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada de anticorpo dependerá do tipo de doença a ser tratada, como definido acima, da severidade e curso da doença, se o anticorpo for administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia prévia, da história clínica do paciente e resposta ao anticorpo, e da descrição do médico atendente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente de uma vez ou durante uma série de tratamentos.

Em todo caso, as formulações deveriam fornecer uma quantidade de anticorpo terapêutico com o passar do tempo que fosse suficiente para mostrar a atividade biológica desejada, por exemplo, prevenir ou minimizar a severidade da doença ou distúrbio relacionado com EphB3. As composições da presente invenção podem ser administradas sozinhas ou como uma terapia adjuntiva junto com outros terapêuticos conhecidos na técnica pelo tratamento de tal infecção.

A composição de anticorpo será formulada, será dosada, e será administrada de um modo de acordo com a boa prática médica. Os fatores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular sendo tratado, o mamífero particular sendo tratado, a condição clínica do paciente individual, a causa do distúrbio, o sítio de liberação do agente, o método de administração, a programação de administração, e outros fatores conhecidos pelos médicos. A quantidade terapeuticamente efetiva do anticorpo a ser administrado será administrada por tais considerações, e é a quantidade mínima necessária para prevenir, melhorar, ou tratar a doença, condição ou distúrbio mediada pelo alvo. Tal quantidade está preferivelmente abaixo da quantidade que é tóxica ao hospedeiro ou torna o hospedeiro significativamente mais suscetível a infecções.

O anticorpo não necessita ser, mas é opcionalmente formulado com um ou mais agentes atualmente usados para prevenir ou tratar o distúr-

bio em questão. A quantidade efetiva de tais outros agentes depende da quantidade de anticorpo presente na formulação, do tipo de doença, condição ou distúrbio ou tratamento, e outros fatores descritos acima. Estes são geralmente usados nas mesmas dosagens e com rotinas de administração como usado aqui anteriormente ou acima de 1 a 99% das dosagens antes empregadas.

Em outra modalidade da invenção, é fornecido um artigo de fabricação contendo materiais úteis para o tratamento da condição desejada. O artigo de fabricação compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, e tubos de teste. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais tal como vidro ou plástico. O recipiente segura uma composição que é efetiva para tratar a condição e pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que tem uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é o anticorpo da invenção. O rótulo em, ou associado com, o recipiente indica que a composição é usada para tratar a condição de escolha. O artigo de fabricação pode também compreender um segundo recipiente contendo um segundo agente terapêutico (incluindo quaisquer dos segundos agentes terapêuticos para doenças descritas aqui ou conhecidas na técnica). O artigo de fabricação pode também compreender outro recipiente que contém um tampão farmacologicamente aceitável, tal como solução salina tamponada por fosfato, solução de Ringer ou solução de dextrose para reconstituir uma formulação de anticorpo liofilizada. Pode também incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e de usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e inserções de embalagem com instruções para uso.

#### Imunoterapia

Os anticorpos úteis no tratamento de pacientes que têm doenças ou distúrbios relacionados com EphB3 podem incluir aqueles que são capazes de iniciar uma resposta imune potente contra, ou capaz de citotoxicidade contra, a célula que expressa EphB3. Os anticorpos conjugados para agen-

tes citotóxicos podem ser usados para alvejar os agentes citotóxicos para tecidos que expressam EphB3. Alternativamente, os anticorpos podem extrair lise de célula por mecanismos de citotoxicidade de célula dependente de anticorpo ou mediada por complemento (ADCC), ambos dos quais reque-

5 rem uma porção de Fc íntata da molécula de imunoglobulina para interação com sítios de receptor de Fc de célula efetora ou proteínas de complemento. Além disso, os anticorpos que exercem um efeito biológico direto no crescimento de célula são úteis na prática da invenção.

Os anticorpos Anti-EphB3 podem ser administrados em sua forma "nua" ou não conjugada, ou podem ser conjugados diretamente para outros agentes terapêuticos ou diagnóstico, ou podem ser conjugados indiretamente para polímero portador que compreende tais outros agentes terapêuticos ou diagnóstico.

10

Os anticorpos podem ser detectavelmente rotulados pelo uso de radioisótopos, rótulos de afinidade (tais como biotina, avidina, etc.), rótulos enzimáticos (tais como, rábano picante peroxidase, alcalino fosfatase, etc.), rótulos fluorescentes ou luminescentes ou bioluminescentes (tal como FITC ou rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, e similares. Os procedimentos para realizar tal rotulação são bem conhecidos na técnica; por exemplo, veja

15 (Sternberger, L.A. e outros, *J. Histochem. Cytochem.* 18:315 (1970); Bayer, E.A. e outros, *Meth. Enzym.* 62:308 (1979); Engval, E., e outros, *Immunol.* 109:129 (1972); Goding, J.W. o *J. Immunol. Meth.* 13:215 (1976)).

20

Conjugação de porções de anticorpo é descrita na Patente U.S. Nº 6.306.393. Técnicas gerais são da mesma forma descritas em Shih e outro, *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih e outro, *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); e Shih e outro, Patente U.S. Nº 5.057.313. Este método geral envolve reagir um componente de anticorpo que tem uma porção de carboidrato oxidada com um polímero de veículo que tem pelo menos uma função de amina livre e que é carregada com uma pluralidade de fármaco, toxina,

25

30 quelador, adendos de boro, ou outro agente terapêutico. Esta reação resulta em uma ligação de base de Schiff inicial (imina), que pode ser estabilizada por redução a uma amina secundária para formar o conjugado final.

O polímero de veículo pode ser, por exemplo, um aminodextrana ou polipeptídeo de pelo menos 50 resíduos de aminoácido. Várias técnicas para conjugar um fármaco ou outro agente ao polímero de veículo são conhecidas na técnica. Um veículo de polipeptídeo pode ser usado em vez de aminodextrano, porém o veículo de polipeptídeo deve ter pelo menos 50 resíduos de aminoácido na cadeia, preferivelmente 100-5000 resíduos de aminoácido. Pelo menos alguns dos aminoácidos devem ser resíduos de lisina ou glutamato ou resíduos de aspartato. As amins pendentes de resíduos de lisina e carboxilatos pendente de glutamina e aspartato são convenientes para ligar um fármaco, toxina, imunomodulador, quelador, adendos de boro ou outro agente terapêutico. Exemplos de veículos de polipeptídeo adequados incluem polilisina, ácido poliglutâmico, ácido poliaspártico, co-polímeros dos mesmos, e polímeros misturados destes aminoácidos e outros, por exemplo, serinas, para conferir propriedades de solubilidade desejáveis sobre o conjugado e veículo carregado resultante.

Alternativamente, anticorpos conjugados podem ser preparados conjugando-se diretamente um componente de anticorpo com um agente terapêutico. O procedimento geral é análogo ao método indireto de conjugação a não ser que um agente terapêutico seja ligado diretamente a um componente de anticorpo oxidado. Por exemplo, uma porção de carboidrato de um anticorpo pode ser ligada ao polietilenoglicol para prolongar a meia-vida.

Alternativamente, um agente terapêutico pode ser ligado na região de articulação de um componente de anticorpo reduzido por formação de ligação de dissulfeto, ou usando um reticulador heterobifuncional, tal como N-sucinil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Yu e outro, *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). Técnicas gerais para tal conjugação são bem conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upeslakis e outro, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," em *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch e outro, (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," em *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*,

Ritter e outro (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). Uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncional é conhecida na técnica, tal como N-sucinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), imino-tiolano (IT), derivado bifuncional de imidoésteres (tal como HCL de dimetil adipimidato), ésteres ativos (tal como dissucinimidil suberato), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoi) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como tolieno 2,6-diisocianato), e compostos de flúor bis-ativos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

10 Finalmente, proteínas de fusão podem ser construídas as quais compreendem uma ou mais porções de anticorpo anti-EphB3 e outro polipeptídeo. Métodos de preparar proteínas de fusão de anticorpo são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.306.393. Proteínas de fusão de anticorpo que compreendem um porção de interleucina-2  
15 são descritas por Boleti e outro, Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet e outro, Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker e outro, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank e outro, Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), e Hu e outro, Cancer Res. 56:4998 (1996).

Os anticorpos da invenção podem ser administrados em sua  
20 forma "nua" ou não conjugada, ou podem ter os agentes terapêuticos conjugados por eles.

A presente invenção também fornece os anticorpos acima descritos em forma detectavelmente rotulada. Anticorpos podem ser detectavelmente rotulados através do uso de radioisótopos, rótulos de afinidade  
25 (tais como biotina, avidina, etc.), rótulos enzimáticos (tais como peroxidase de rábano picante, fosfatase alcalina, etc.) rótulos fluorescentes ou luminescentes ou bioluminescentes (tal como FITC ou rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, e similares. Procedimentos por realizar tal rotulagem são bem conhecidos na técnica; por exemplo, veja (Sternberger, L.A. e outro, J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. e outro, Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. e outro, Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).  
30

"Rótulo" refere-se a uma composição ou composto detectável que é conjugado diretamente ou indiretamente ao anticorpo. O rótulo pode, por si próprio, ser detectável (por exemplo, rótulos de radioisótopo ou rótulos fluorescentes) ou, no caso de um rótulo enzimático, pode catalisar a alteração química de uma composição ou composto de substrato que é detectável. Alternativamente, o rótulo pode não ser detectável isoladamente, porém, pode ser um elemento que é ligado por outro agente que é detectável (por exemplo, um rótulo de epítipo ou um dente um oar de ligação tal como biotina-avidina, etc.) Desse modo, o anticorpo pode compreender um rótulo ou etiqueta que facilita seu isolamento, e métodos da invenção para identificar os anticorpos incluem uma etapa de isolar o anticorpo através da interação com o rótulo ou etiqueta.

A produção de imunconjugados é descrita na Patente U.S. Nº 6.306.393. Imunoconjugados podem ser preparados conjugando-se indiretamente um agente terapêutico a um componente de anticorpo. Técnicas gerais são descritas em Shih e outro, *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih e outro, *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); e Shih e outro, Patente U.S. Nº 5.057.313. O método geral envolve reagir um componente de anticorpo que tem uma porção de carboidrato oxidada com um polímero de veículo que tem pelo menos uma função de amina livre e que é carregado com uma pluralidade de fármaco, toxina, quelador, adendos de boro, ou outro agente terapêutico. Esta reação resulta em uma ligação de base de Schiff inicial (imina) que pode ser estabilizada por redução em uma amina secundária para formar o conjugado final.

O polímero de veículo é preferivelmente uma aminodextrana ou polipeptídeo de pelo menos 50 resíduos de aminoácido, embora outros veículos de polímero substancialmente equivalentes possam ser usados. Preferivelmente, o imunoconjugado final é solúvel em uma solução aquosa, tal como soro mamífero, para facilidade de administração e alvejamento eficaz para uso em terapia. Desse modo, funções de solubilização no polímero de veículo realçarão a solubilidade de soro do imunoconjugado final. Em particular, uma aminodextrana será preferida.

O processo para preparar um imunoc conjugado com um com um veículo de aminodextrana tipicamente começa com um polímero de dextrana, vantajosamente uma dextrana de peso molecular médio de cerca de 10.000-100.000. A dextrana é reagida com um agente de oxidação para afetar uma oxidação controlada de uma porção de seus anéis de carboidrato para gerar os grupos de aldeído. A oxidação é convenientemente realizada com reagentes químicos glicolíticos tal como  $\text{NaIO}_4$ , de acordo com procedimentos convencionais.

A dextrana oxidada é em seguida reagida com uma poliamina, preferivelmente uma diamina, e mais preferivelmente, uma mono- ou poliidróxi diamina. Aminas adequadas incluem etileno diamina, propileno diamine, ou outras polimetileno diaminas similares, dietileno triamina ou poliaminas similares, 1,3-diamino-2-hidroxipropano, ou outras poliaminas ou diaminas hidroxiladas similares. Um excesso da amina relativo aos grupos aldeído da dextrana é usado para garantir a conversão substancialmente completa das funções de aldeído em grupos de base de Schiff.

Um agente de redução, tal como  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  ou similares, é usado para realizar a estabilização redutiva do intermediário de base de Schiff resultante. O aduto resultante pode ser purificado por passagem através de uma coluna de delimitação convencional para remover as dextranas reticuladas.

Outros métodos convencionais de derivação de uma dextrana para introduzir as funções de amina podem da mesma forma ser usados, por exemplo, reação com brometo de cianogênio, seguido por reação com uma diamina.

A aminodextrana é em seguida reagida com um derivado do fármaco particular, toxina, quelador, imunomodulador, adendo de boro, ou outro agente terapêutico a ser carregado, em uma forma ativada, preferivelmente, um derivado ativado por carboxila, preparado por meios convencionais, por exemplo, usando dicicloexilcarbodiimida (DCC) ou uma variante solúvel em água dos mesmos, para formar um aduto intermediário.

Alternativamente, polipeptídeos podem ser acoplados em ami-

nodextrana por condensação de glutaraldeído ou por reação de grupos carboxila ativados na proteína com aminas na aminodextrana.

Queladores para radiometais ou realçadores de ressonância magnética são bem conhecidos na técnica. Típicos são derivados de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) e ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA). Estes queladores tipicamente têm grupos na cadeia lateral pela qual o quelador pode ser ligado a um veículo. Tais grupos incluem, por exemplo, benzilisotiocianato, pelo qual o DTPA ou EDTA pode ser acoplado ao grupo amina de um veículo. Alternativamente, grupos carboxila ou grupos amina em um quelador podem ser acoplados a um veículo por ativação ou derivação anterior e em seguida acoplando, todos por meios bem conhecidos.

Adendos de boro, tais como carboranos, podem ser ligados aos componentes de anticorpo por métodos convencionais. Por exemplo, carboranos podem ser preparados com funções de carboxila em cadeias laterais pendentes, como é bem conhecido na técnica. A ligação de tais carboranos a um veículo, por exemplo, aminodextrana, pode ser obtida por ativação dos grupos carboxilas dos carboranos e condensação com aminas no veículo para produzir um conjugado intermediário. Tais conjugados intermediários são em seguida ligados aos componentes de anticorpo para produzir imunoconjugados terapeuticamente úteis, como descrito abaixo.

Um veículo de polipeptídeo pode ser usado em vez de aminodextrana, porém o veículo de polipeptídeo deve ter pelo menos 50 resíduos de aminoácido na cadeia, preferivelmente 100-5000 resíduos de aminoácido. Pelo menos alguns dos aminoácidos devem ser resíduos de lisina ou glutamato ou resíduos de aspartato. As aminas pendentes de resíduos de lisina e carboxilatos pendentes de glutamina e aspartato são convenientes para ligar um fármaco, toxina, imunomodulador, quelador, adendos de boro ou outro agente terapêutico. Exemplos de veículos de polipeptídeo adequados incluem polilisina, ácido poliglutâmico, ácido poliaspártico, co-polímeros dos mesmos, e polímeros misturados destes aminoácidos e outros, por exemplo, serinas, para conferir as propriedades de solubilidade desejáveis no imunoconjugado e veículo carregado resultante.

Conjugação do intermediário conjuga com o componente de anticorpo é efetuado oxidando a porção de carboidrato do componente de anticorpo e reagindo o aldeído resultante (e cetona) carbonilas com grupos amina permanecendo no veículo depois de carregar com um fármaco, toxina, quelador, imunomodulador, adendo de boro, ou outro agente terapêutico. Alternativamente, um conjugado intermediário pode ser ligado a um componente de anticorpo oxidado por grupos amina que foram introduzidos no conjugado intermediário depois de carregar com o agente terapêutico. Oxidação é realizada convenientemente quimicamente, por exemplo, com  $\text{NaIO}_4$  ou outro reagente glicolítico, ou enzimaticamente, por exemplo, com neuraminidase e galactose oxidase. No caso de um veículo de aminodextrana, nem todas as aminas da aminodextrana são tipicamente usados para carregar um agente terapêutico. As aminas restantes de aminodextrana condensam com o componente de anticorpo oxidado para formar adutos de base de Schiff, que são em seguida redutivamente estabilizadas, normalmente com um agente de redução de boroidreto.

Procedimentos análogos são usados para produzir outros imunokonjugados de acordo com a invenção. Veículos de polipeptídeo carregados preferivelmente têm resíduos de lisina livre que permanecem para condensação com a porção de carboidrato oxidada de um componente de anticorpo. Carboxilas no veículo de polipeptídeo podem, se necessário, ser convertidos em aminas, por exemplo, por ativação com DCC e reação com um excesso de uma diamina.

O imunokonjugado final é purificado usando técnicas convencionais, tal como cromatografia de delimitação em Sephacryl S-300 ou cromatografia de afinidade usando um ou mais epítopos de CD84Hy.

Alternativamente, imunokonjugados podem ser preparados diretamente conjugando um componente de anticorpo com um agente terapêutico. O procedimento geral é análogo ao método indireto de conjugação a não ser que um agente terapêutico seja ligado diretamente a um componente de anticorpo oxidado.

Como uma ilustração adicional, um agente terapêutico pode ser

ligado na região de articulação de um componente de anticorpo reduzido por formação de ligação de dissulfeto. Por exemplo, os peptídeos toxóides de tétano podem ser construídos com um único resíduo de cisteína que é usado para ligar o peptídeo a um componente de anticorpo. Como uma alternativa,

5 tais peptídeos podem ser ligados ao componente de anticorpo usando um reticulador heterobifuncional, tal como N-sucinil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Yu e outro, *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). Técnicas gerais para tal conjugação são conhecidas na técnica. Por exemplo, veja Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upeslakis e

10 outro, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch e outro (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter e outro (eds.), pages 60-84 (Cambridge

15 University Press 1995).

Conjugados do anticorpo e o agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncional tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivado bifuncional de imidoésteres (tal como HCL de dimetil adipimidato), ésteres

20 ativos (tal como dissuccinimidil suberato), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato tolieno), e compostos de flúor bis-ativos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, um conjugado

25 de peptídeo pode ser preparado como descrito em Vitetta e outro, *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminapentacético carbono-14-rotulado (MX-DTPA) é um conjugado de agente de que-  
 lação exemplar (veja, por exemplo, WO94/11026).

Como descrito acima, porções de carboidrato na região de Fc de

30 um anticorpo podem ser usadas para conjugar um agente terapêutico. Porém, a região de Fc pode ser ausente se um fragmento de anticorpo for usado como o componente de anticorpo do imunoconjugado. Não obstante, é

possível introduzir um porção de carboidrato na região variável de cadeia leve de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Por exemplo, veja Leung e outro, J. Immunol. 154:5919 (1995); Hansen e outro, Patente U.S. Nº 5.443.953. A porção de carboidrato criada é usada em seguida para ligar um agente terapêutico.

Além disso, aqueles de experiência na técnica reconhecerão numerosas possíveis variações dos métodos de conjugação. Por exemplo, a porção de carboidrato pode ser usada para ligar polietilenoglicol para prolongar a meia-vida de um anticorpo intacto, ou fragmento de ligação de antígeno dos mesmos, no sangue, linfa, ou outros fluidos extracelulares. Além disso, é possível construir um "imunoconjugado divalente" ligando-se os agentes terapêuticos a um porção de carboidrato e a um grupo sulfidril livre. Um tal grupo sulfidril livre pode estar localizado na região de articulação do componente de anticorpo.

#### 15 Proteínas de Fusão de Anticorpo

A presente invenção considera o uso de proteínas de fusão compreendendo uma ou mais porções de anticorpo e outro polipeptídeo, tal como um imunomodulador ou outro agente terapêutico. Métodos de preparar proteínas de fusão de anticorpo são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.306.393. Proteínas de fusão de anticorpo compreendendo uma porção de interleucina-2 são descritas por Boleti e outro, Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet e outro, Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker e outro, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank e outro, Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), e Hu e outro, Cancer Res. 56:4998 (1996). Além disso, Yang e outro, Hum. Antibodies Híbridomas 6:129 (1995), descreve uma proteína de fusão que inclui um fragmento de F(ab')<sub>2</sub> e uma porção alfa de fator de necrose de tumor.

Métodos de preparar proteínas de fusão em que uma molécula recombinante compreende um ou mais componentes de anticorpo e outro agente terapêutico da mesma forma são conhecidos por aqueles de experiência na técnica. Por exemplo, veja Chaudhary e outro, Nature 339:394 (1989), Brinkmann e outro, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra

e outro, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman e outro, J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels e outro, Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya e outro, J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan e outro, Biochemistry 35:2872 (1996), e Schmidt e outro, Int. J. Can. 65:538 (1996); Kreitman e  
 5 outro, Leukemia 7:553 (1993), Nicholls e outro, J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson e outro, J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), e Valleria e outro, Blood 88:2342 (1996); Deonarain e outro, Tumor targeting 1:177 (1995), Linardou e outro, Cell Biophys. 24-25:243 (1994), Wang e outro, Resumos do 209<sup>a</sup> ACS Nacional Meeting, Anaheim, Calif., 2-6 de abril de 1995, Parte  
 10 1, BIOT005; Dohlsten e outro, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994).

Enzimas que são útil no método desta invenção incluem, porém não são limitadas a, fosfatase alcalina útil para converter pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para converter pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; proteases, tal como serratia  
 15 protease, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-fármacos contendo peptídeo em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-fármacos que contêm substituintes de D-aminoácido; enzimas de clivagem de carboidrato tal como  $\beta$ -galactosidase e neuraminidase úteis para  
 20 converter pró-fármacos glicosilados em fármacos livres;  $\beta$ -lactamase útil para converter fármacos derivados com  $\beta$ -lactams em fármacos livres; e amidases de penicilina, tal como amidase de penicilina V ou amidase de penicilina G, útil para converter fármacos derivados em seus nitrogênios de amina com grupos fenoxiacetila ou fenilacetila, respectivamente, em fármacos li-  
 25 vres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, da mesma forma conhecidos na técnica como abzimas, podem ser usados para converter os pró-fármacos da invenção em fármacos ativos livres (Veja, por exemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Conjugados de anticorpo-abzima podem ser preparados como descrito aqui para liberação da abzima a uma po-  
 30 pulação de célula desejada.

As enzimas desta invenção podem ser covalentemente ligadas aos anticorpos por técnicas bem conhecidas na arte tal como o uso dos rea-

gentes de reticulação heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, proteínas de fusão que compreendem pelo menos a região de ligação de antígeno de um anticorpo da invenção ligado a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma enzima da invenção podem ser construídas usando técnicas de DNA recombinantes conhecidas na técnica (Veja, por exemplo, Neuberger e outro, Nature 312: 604-608 (1984))

#### Usos Não terapêuticos

Os anticorpos da invenção podem ser usados como agentes de purificação de afinidade para antígeno alvo ou em ensaios diagnósticos para antígeno alvo, por exemplo, detectando sua expressão em células específicas, tecidos, ou soro. Os anticorpos podem da mesma forma ser usados para ensaios diagnósticos *in vivo*. Geralmente, para estes propósitos o anticorpo é rotulado com um radionuclídeo (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ ) de forma que o local possa estar localizado usando imunocintigrafia.

Os anticorpos da presente invenção podem ser empregados em qualquer método de ensaio conhecido, tais como ensaios de ligação competitivos, ensaios sanduíche direto e indireto, tais como ELISAs, e ensaios de imunoprecipitação. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987). Os anticorpos podem da mesma forma ser usados para imunoistoquímica, para rotular amostras de célula usando métodos conhecidos na técnica.

Como uma matéria de conveniência, o anticorpo da presente invenção pode ser fornecido em um *kit*, isto é, uma combinação empacotada de reagentes em quantidades pré-determinadas com instruções para realizar o ensaio diagnóstico. Onde o anticorpo é rotulado com uma enzima, o *kit* incluirá substratos e co-fatores requeridos pela enzima (por exemplo, um precursor de substrato que fornecer o cromóforo ou fluoróforo detectável). Além disso, outros aditivos podem ser incluídos tais como estabilizadores, tampões (por exemplo, um tampão de bloco ou tampão de lise) e similares. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas amplamente para fornecer concentrações em solução dos reagentes que substan-

cialmente otimizam a sensibilidade do ensaio. Particularmente, os reagentes podem ser fornecidos como pós secos, normalmente liofilizados, incluindo excipientes que na dissolução fornecerão uma solução de reagente que tem a concentração apropriada.

## 5 EXEMPLOS

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos, que não são destinados a se limitantes de qualquer maneira.

### EXEMPLO 1

#### PREPARAÇÃO DE DOMÍNIO EXTRACELULAR DE EPHB3 (ECD)

10 Para expressão recombinante do ECD de EphB3, um método de PCR aninhado foi primeiro empreendido para incorporar etiquetas e criar as extremidades da região de codificação na preparação para incorporação em um vetor de expressão. Iniciadores usados foram como segue (todos são escritos como seqüências de 5' a 3'):

15 Dianteiro #1:

TCGTATACATTTCTTACATCTATGCGCTGGAAGAGACCCTCATGGACAC  
AAA

(SEQ ID NO: 420)

Dianteiro #2:

20 GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGA  
AATTCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTTATGGTCGTATACATTTCTTACA  
TCTATGCG

(SEQ ID NO: 421)

Reverso #1:

25 CGGGTCGTGAGGTCCTCGTCGAAGGGCCTCGTGTAGTGGTAGTGGTA  
GTGCCT

(SEQ ID NO: 422)

Reverso #2:

30 CCTCGTGTAGTGGTAGTGGTAGTGCCTCGAATTTGGGTCGAAAGAACAT  
GTTTCACCAGGG

(SEQ ID NO: 423)

Amplificação de PCR foi realizada usando Mistura PfuUltra™

Hotstart PCR Master (Stratagene) de acordo com a recomendação do fabricante. O padrão usado para a amplificação foi um fragmento de ECD de EphB3 clonado em pDONOR201. O produto de PCR de ECD foi clonado em pBlueBac4.5GW usando a estratégia de clonagem de topoisomerase. Os clones selecionados finais foram confirmados por sequenciamento de filamento duplo. 10-20 µg de DNA que representa cada clone foi preparado para transfecção de inseto.

As construções recombinantes foram usadas para expressar o ECD de EphB3 em células de inseto como segue. Baculovírus foi isolado por purificação de placa de uma co-transfecção de DNA de plasmídeo que codifica o domínio extracelular de EphB3 com DNA Autographa californica genômico Sapphire™. Vírus recombinante foi amplificado e usado para infectar células de inseto Tn5 em densidades que variam de  $1 - 1,5 \times 10^6$  de células por ml, multiplicidade de infecção (moi) varia de 2-10 em um biorreator de onda de 10L (volume de preparação). Seguindo 48 horas de infecção, as células e o sobrenadante foram coletados e centrifugados, e o sobrenadante foi preparado para concentração. O sobrenadante foi clarificado em um cartucho de fibra oco de 0,45 µm depois da concentração de 8x com uma membrana de corte de 10kDa MW de fluxo tangencial. Antes da purificação de proteína, o sobrenadante foi esterilizado por filtro com um frasco à vácuo de poro de 0,2µm, de 1L.

ECD de EphB3 foi purificado como segue. O sobrenadante de cultura de célula de inseto que contém ECD de EphB3 foi passado em uma taxa de fluxo de 13ml/min em uma coluna de Quelação de Ni de 25mL (Número de Catálogo da Resina G.E. 17-5318-03) equilibrada no Tampão A (PBS / 0,35M de NaCl / 5mM de Imidazol). A proteína ligada contendo ECD de EphB3 foi eluída usando um gradiente de 30-coluna-volume de Tampão A para Tampão B (PBS / 0,35M de NaCl / 250mM de Imidazol). As frações foram examinadas por SDS-PAGE, e aquelas contendo ECD de EphB3 na pureza desejada foram agrupados. O *pool* foi dializado vs. Tampão A e passado sobre as colunas HisTrap (G.E.) de 2x5mL. As colunas HisTrap foram eluídas no mesmo aspecto como a primeira coluna de Quelação de Ni. As

frações foram examinadas por SDS-PAGE, e aquelas contendo proteína de ECD de EphB3 na pureza desejada foram agrupadas. O *pool* final foi dializado vs. PBS / 0,1M de Arginina. O material final foi analisado para identidade e pureza por sequenciamento de N-terminal bem como SDS-PAGE reduzido e não reduzido (manchamento de Coomassie e análise do Oeste).

### EXEMPLO 2

#### IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS DE ALVO SEGREGADOS POR HIBRIDOMAS DE MURINO

O imunógeno usado para geração de hibridoma foi uma forma recombinante do domínio extracelular (ECD) (correspondente aos aminoácidos 37 - 558 de SEQ ID NO: 2) de EphB3 humano, que foi gerado usando o sistema de expressão de célula de inseto / baculovírus. Para as imunizações, o ECD foi misturado com um volume igual de adjuvante, e a mistura foi subcutaneamente injetada na superfície ventral das almofadas das patas do membro traseiro. Os ratos foram injetados com o imunógeno cada 3 - 14 dias de acordo com vários horários de imunização, para produzir uma resposta imune forte. Os camundongos que mostram uma resposta imune boa foram em seguida sacrificados, os linfonodos foram colhidos, e as células B nos linfonodos foram coletadas. As células B foram em seguida fundidas em células de mieloma para produzir hibridomas de acordo com as técnicas bem conhecidas na arte, e os hibridomas foram avaliados e para produzir aqueles anticorpos que reconhecem a proteína de EphB3 em ensaios ELISA e FACS.

### EXEMPLO 3

#### IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS DE ALVO POR EXIBIÇÃO DE FAGO

##### Avaliação de Anticorpos.

Para isolar um painel de anticorpos anti-EphB3, uma biblioteca de exibição de fago Omniclonal (Buechler e outro, Número de Patente 6057098) foi avaliada a qual foi gerada a partir de camundongos hiperimunizados com o domínio extracelular (ECD) de EphB3.

Colônias únicas, obtidas da biblioteca Omniclonal de acordo com

o protocolo na Patente U.S. Nº 6.057.098, foram avaliadas quanto a atividade de ligação em um ensaio ELISA. Brevemente, microculturas foram cultivadas em uma  $OD_{600}=0,6$  em que a expressão pontual do fragmento de anticorpo solúvel foi induzida por adição de 0,2% em p/v de arabinose seguido por cultura durante a noite em uma incubadora agitadora a 30°C. As bactérias foram centrifugadas e o extrato periplásmico foi preparado e usado para detectar a atividade de ligação de anticorpo em EphB3-ECD imobilizado em microplacas Nunc MaxiSorp™ seguindo o protocolo de ELISA padrão fornecido pelo fabricante de microplaca. A ligação de anticorpo foi da mesma forma avaliada medindo-se a ligação em células de expressão de EphB3 de CHO-K1 usando análise de Classificação de Célula Ativada por Fluorescência (FACS).

#### Conversão de Candidatos de Anticorpo Identificados Por Exibição de Fago em IgG Completo

Para converter os aglutinantes candidatos de chumbo da avaliação inicial em anticorpos que compreendem regiões constantes de cadeia leve e pesada de anticorpo, as seqüências de codificação para as regiões variáveis de ambas as cadeias pesada e leve de aglutinantes foram clonadas em um vetor de expressão de mamífero proprietário (WO 2004/033693) codificando para os genes de região constante de capa ( $\kappa$ ) e gama-1 ( $\gamma 1$ ).

Anticorpos foram transitoriamente expressos em células 293E como descrito em Handa e outro (2004 American Society of Cancer Biology Poster #1937). O sobrenadante de células transfectadas foram colhidos no dia 6 de cultura e IgG foi purificado usando Proteína A Sepharose (GE Healthcare) seguindo o protocolo dos fabricantes.

#### EXEMPLO 4

##### BINNING DE EPÍTOPO DE ANTICORPO DE EPHB3

Os anticorpos anti-EphB3 foram nomeados em compartimentos de epítipo por uma estratégia de ensaio de competição serial usando tecnologias de ressonância de plasmônio de superfície (SPR). Neste método, um anticorpo foi imobilizado sobre um *chip* de sensor, diretamente ou através de um agente de captura, e permitido ligar o ligante (ECD de EphB3) quando foi

injetado sobre o anticorpo imobilizado. Um segundo anticorpo teste foi subsequentemente injetado, e sua capacidade de ligar o ligante capturado pelo primeiro anticorpo foi determinada. Se os anticorpos ligam-se em epítomos espacialmente separados no ligante, o segundo anticorpo deve da mesma forma poder ligar o complexo de anticorpo do ligante/primeiro anticorpo. A capacidade de dois anticorpos diferentes ligar simultaneamente a mesma molécula de ligante é referida como emparelhamento.

5 1. As primeiras séries de experiências utilizaram um *chip* sensor CM5 revestido com uma alta densidade de anticorpo específico de Fc anti-Camundongo de Coelho (RAM-Fc) em todas as células de fluxo.

a. O tampão de funcionamento foi HBS-EP (Biacore®, Inc.), a temperatura foi fixada a 25°C, e a taxa de fluxo foi 10 µL/min.

b. Um anticorpo diferente foi capturado em cada célula de fluxo injetando uma diluição de 1-10 µg/mL durante 1-3 minutos resultando em um nível de captura de 200-1000 RU.

c. A superfície foi em seguida bloqueada injetando 100µg/mL de IgG de camundongo em HBS-EP durante 30 minutos.

d. O anticorpo a ser testado por emparelhar foi injetado em 1 µg/mL para verificar que o *chip* foi bloqueado eficazmente e determinar o nível de ligação da base do anticorpo.

e. O ligante foi injetado em 2-10 µg/mL durante 2-4 minutos.

f. O anticorpo a ser emparelhado foi novamente injetado como na etapa 1d acima. Se o anticorpo ligou-se durante esta injeção, os dois anticorpos formam um par, e portanto são colocados em compartimentos de epítopo separados. Se o segundo anticorpo não ligou, ele compete com o primeiro anticorpo para ligação, e eles são colocados no mesmo, ou em compartimentos de epítopo sobrepostos.

g. Como um controle para auto-emparelhar, cada um dos anticorpos capturados foi testado para emparelhar com si mesmo.

2. Logo que vários compartimentos de epítopo, ou conjuntos puros de anticorpos não emparelhados, foram elucidados, esses anticorpos foram usados para também investigar mais os anticorpos. Quatro anticorpos

de cada vez foram usados para interrogar os anticorpos de uma maneira consecutiva. Capturando-se um anticorpo de hibridoma de um compartimento de epítipo diferente em cada dentre as quatro células de fluxo, seguido realizando-se o protocolo de emparelhamento acima descrito através de todos os todos de uma vez, um conjunto de amostra maior foi interrogado.

3. Este processo foi usado para avaliar o fragmento Fab de anticorpo humano também, com a modificação que a etapa de bloqueio usando 100 µg/mL de IgG de camundongo não foi usada, visto que a superfície de RAM-Fc não captura os Fabs humanos.

#### 10 EXEMPLO 5

#### SELEÇÃO DE ANTICORPOS DE EPHB3 DE ANTAGONISTA USANDO ENSAIOS COM BASE EM CITOMETRIA E DETECÇÃO DE DEGRADAÇÃO E FOSFORILAÇÃO DE EPHB3

15 Para identificar os anticorpos antagonistas alvejados em EphB3, um ensaio com base em citometria de fluxo (FACS) foi desenvolvido para monitorar efeitos a jusantes de ativação de receptor (por exemplo, um ensaio de fosfo-tirosina (pY) celular total, como uma medida da ativação de séries de reação de sinalização).

#### Fosforilação de tirosina celular total

20 O ensaio de pY celular total empregou uma linhagem celular de CHO estavelmente transfectada, adaptada à suspensão expressando níveis altos do receptor. Este ensaio foi usado para avaliar os sobrenadantes de hibridoma, anticorpos derivados de hibridoma purificados, e anticorpos derivados de exibição de fago reformatados de IgG completo purificados.

25 Células CHO-K1 adaptadas à suspensão super-expressando EphB3 foram semeadas em uma placa de 96 cavidades de base redonda em  $2 \times 10^5$  células/cavidade. Anticorpo contra EphB3 foi em seguida diluído 1:10 diretamente em cada cavidade de amostra. As amostras foram incubadas durante 40 - 45 minutos a 37°C. Depois da incubação, as células foram  
30 fixadas com formaldeído a 2% durante 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram em seguida lavadas 2X com tampão de permeabilização e ressuspensas em tampão de permeabilização que contém anticorpo anti-

fosfotirosina de camundongo conjugado de PE (PY20). As células foram incubadas durante 1 hora a 4°C, lavadas 2X com tampão de permeabilização, e analisadas por citometria de fluxo.

- 5 Aproximadamente 24% dos anticorpos testados mostraram atividade agonística no ensaio de pY. Três anticorpos (XPA.04.017, XHA.05.172, e XHA.05.849) causaram uma redução no manchamento de fosfotirosina de FACS na ordem de 1,5 vez e dois destes anticorpos (XPA.04.017 e XHA.05.172) mapeados em um compartimento de epítipo separado relativo aos anticorpos de agonista, indicando que estes dois anticorpos identificam
- 10 um único epítipo associado com efeitos antagonísticos de EphB3. Dois anticorpos (XPA.04.019 E XPA.04.031) que mostrou atividade de agonista mínima impediu a ligação de EphrinB2 (descrito também abaixo).

#### EXEMPLO 6

#### 15 ENSAIO DE COMPETIÇÃO DE LIGAÇÃO DE EPHRINB2 E ENSAIO DE COMPETIÇÃO DE EPÍTOPO

##### A. Preparação de *Chip* de Sensor Flexchip

- A plataforma de ensaio de Flexchip (Biacore, Uppsala Sweden) foi usada para rapidamente testar os três anticorpos antagonísticos anti-EphB3 identificados para competição de ligação com representantes de outros sete compartimentos de epítipo identificados e da mesma forma determinar se ou não os antagonistas, bem como anticorpos de agonista dos outros sete compartimentos competem com o ligante de EphrinB2 para ligação ao EphB3-ECD.
- 20

- Os anticorpos purificados foram manchados em duplicata sem diluição sobre uma lâmina Flexchip dourada simples, usando uma ponta de pipeta de 25 µL. EphB3-ECD recombinante e Proteína A/G foram manchadas em triplicata. As concentrações de proteína são resumidas na Tabela 4. Depois do manchamento, o *chip* foi colocado em uma câmara de umidade a 85% durante 1,5 hora, em seguida colocado durante a noite a 4°C.
- 25

Tabela 4. Reagentes manchados sobre a superfície do *chip* de sensor Flex-  
*chip*.

| Amostra                                                 | Concentração (mg/mL) |
|---------------------------------------------------------|----------------------|
| EphB3-ECD                                               | 1,8                  |
| Quimera de Ephrin-B2/Fc de Ca-<br>mundongo Recombinante | 0,5                  |
| XHA.05.849                                              | 1,1                  |
| XHA.05.172                                              | 4,4                  |
| XPA.04.017-IgG                                          | 0,5                  |
| XPA.04.031-IgG                                          | 1,4                  |
| XPA.04.019-IgG                                          | 2,1                  |
| Proteína A/G                                            | 0,5                  |

Depois que o *chip* foi manchado, o Flexchip foi equilibrado com  
tampão de funcionamento PBST (Solução salina tamponada de fosfato com  
5 Tween 20 a 0,05%). O *chip* foi acoplado e o bloqueio foi realizado usando  
solução de bloqueio 1X Flexchip (Biacore).

#### B. Ensaio de competição de EphrinB2

EphrinB2 em 2 µg/mL em tampão de funcionamento foi injetado  
durante 5 minutos em 500 uL/minuto para verificar que não houve nenhuma  
10 ligação não específica aos anticorpos imobilizados e da mesma forma para  
verificar que é ligado ao EphB3-ECD manchado. Isto foi seguido por uma  
injeção de cinco minutos de EphB3-ECD em 2µg/mL em tampão de funcio-  
namento, seguido imediatamente por outra injeção de cinco minutos de Ep-  
hrinB2. XHA.05.849 não ligou quantidades suficientes de ECD a ser avalia-  
15 das eficazmente neste teste. Todos os outros anticorpos ligaram níveis signi-  
ficantes de EphB3-ECD e todos menos XPA.04.031 e XPA.04.019 permiti-  
ram ligação de EphrinB2 ao ECD capturado pelos anticorpos (veja Tabela 5,  
abaixo). Nenhuma ligação de EphrinB2 ao EphB3-ECD recombinante captu-  
rado por XPA.04.031 e XPA.04.019 foi detectada.

Tabela 5. Ligação de EphrinB2 e EphB3-ECD aos anticorpos manchados

| Ligação de EphrinB2 ao ECD de EphB3 Capturado |                             |                    |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
|                                               | Valores calculados em média |                    |
| Anticorpo                                     | ECD Capturado               | EphrinB2 Capturado |
| XPA.04.017                                    | 225,32                      | 214,75             |
| XHA.05.172                                    | 508,36                      | 511,88             |
| XHA.05.849                                    | -2,11                       | -5,74              |
| XPA.04.031                                    | 461,77                      | 7,68               |
| XPA.04.019                                    | 129,94                      | -0,47              |

### C. Ensaios de Competição de Epítopo

Todas as injeções foram 5 minutos em 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  a menos que de outra maneira notado, e todas as amostras foram diluídas com tampão de funcionamento PBST. EphB3-ECD foi injetado em 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , imediatamente seguido por injeção de um anticorpo teste em 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Subseqüente a cada teste de competição de anticorpo, o *chip* foi regenerado por uma injeção de 30 ° segundos de 10 mM de glicina, pH 2,5, seguido por um fluxo de tampão de cinco minutos, e em seguida uma etapa de fluxo de tampão bloqueio de dez minutos, seguida por outro fluxo de tampão de cinco minutos. Os dados de competição de epítopo foram analisados usando o aspecto de ponto de relato do software de avaliação Flexchip onde uma região designada Começo, Meio, e Fim é selecionada e a resposta média sobre a área selecionada é posta em uma tabela.

Anticorpos XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.017, e um anticorpo de agonista foram usados como as amostras injetadas testadas contra todos os anticorpos manchados. Os dados de cada um dos ciclos de ensaio de competição de epítopo são mostrados abaixo nas Tabelas 6-8.

Tabela 6. Testando XHA.05.172 para competição de ligação de EphB3-ECD com anticorpos manchados em Ensaio de Flexchip.

| Emparelhamento de Flexchip de EphB3 versus XHA.05.172 |                             |                      |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                                                       | Valores calculados em média |                      |
| Anticorpo                                             | ECD Capturado               | XHA.05.172 Capturado |
| XPA.04.017                                            | 96,00                       | -4,10                |
| XHA.05.172                                            | 143,78                      | -39,09               |

| Emparelhamento de Flexchip de EphB3 versus XHA.05.172 |                             |                      |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                                                       | Valores calculados em média |                      |
| Anticorpo                                             | ECD Capturado               | XHA.05.172 Capturado |
| XHA.05.849                                            | 5,77                        | -12,31               |
| XPA.04.031                                            | 161,67                      | 456,86               |
| XPA.04.019                                            | 48,27                       | 112,56               |

Tabela 7. Testando XPA.04.017 para competição de ligação de EphB3-ECD com anticorpos manchados em Ensaio de Flexchip.

| Emparelhamento de Flexchip de EphB3 versus XHA.04.017 |                             |                      |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                                                       | Valores calculados em média |                      |
| Anticorpo                                             | ECD Capturado               | XHA.04.017 Capturado |
| XPA.04.017                                            | 168.61                      | -0.99                |
| XHA.05.172                                            | 307.26                      | -42.69               |
| XHA.05.849                                            | 1.76                        | -5.78                |
| XPA.04.031                                            | 316.07                      | 397.40               |
| XPA.04.019                                            | 57.51                       | 99.72                |

Tabela 8. Testando XHA.05.849 para competição de ligação de EphB3-ECD com anticorpos manchados em Ensaio de Flexchip.

| Emparelhamento de Flexchip de EphB3 versus XHA.05.849 |                             |                      |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                                                       | Valores calculados em média |                      |
| Anticorpo                                             | ECD Capturado               | XHA.05.849 Capturado |
| XPA.04.017                                            | 174,85                      | -3,79                |
| XHA.05.172                                            | 352,48                      | -33,51               |
| XHA.05.849                                            | 11,80                       | -9,29                |
| XPA.04.031                                            | 343,22                      | -17,20               |
| XPA.04.019                                            | 81,29                       | -8,81                |

#### 5 D. Conclusão

Os anticorpos antagonísticos bem como representantes de cada compartimento de agonista foram testados para determinar se sua ligação ao domínio extracelular de EphB3 (ECD) previne a ligação do ligante de EphrinB2 ao ECD. Como mostrado acima, dois dos anticorpos antagonísticos de EphB3, XPA.04.017 e XHA.05.172, prepararam um compartimento único que foi diferente a partir de qualquer dos compartimentos de agonista. Este compartimento foi definido pela capacidade de dois anticorpos competirem

entre si e nenhum dos outros anticorpos dos outros sete compartimentos. Os dois anticorpos, XPA.04.017 e XHA.05.172, da mesma forma não impediram o ECD capturado de ligar-se ao ligante de EphrinB2. Estes dados confirmam que os anticorpos identificados e descritos aqui têm atividade antagonística, ligam-se a um epítipo distinto daqueles dos anticorpos de agonista e têm um mecanismo de ação diferente de competição direta de ligante de EphrinB2. Dois anticorpos, XPA.04.019 e XPA.04.031, tiveram atividade de agonista mínima porém impediram a ligação de EphrinB2 ao ECD capturado (isto é, competidores de ligante) e desse modo podem ser caracterizados como antagonistas. Nenhum dos anticorpos agonísticos demonstrou tal competição de ligação de ligante.

#### EXEMPLO 7

#### HUMANIZAÇÃO DE ANTICORPOS DE MURINO

Este exemplo apresenta um procedimento para humanização de um anticorpo anti-EphB3 de murino.

#### Planejamento de genes para cadeias pesada e leve de XPA.04.017, XPA.04.031 e XPA.04.019 humanizadas

As seqüências de aminoácido de região variável de cadeia leve e cadeia pesada para anticorpos de murino XPA.04.017, XPA.04.031 e XPA.04.019 são mencionadas na Figura 1. A seqüência de um anticorpo humano identificado usando a National Biomedical Foundation Protein Identification Resource ou base de dados similar é usada para fornecer a estrutura do anticorpo humanizado. Para selecionar a seqüência da cadeia pesada humanizada, a seqüência de cadeia pesada de murino é alinhada com a seqüência da cadeia pesada de anticorpo humano. Em cada posição, o aminoácido de anticorpo humano é selecionado para a seqüência humanizada, a menos que a posição inclua-se em qualquer uma das quatro categorias definidas abaixo, caso em que o aminoácido de murino é selecionado:

(1) A posição inclui-se em uma região de determinação de complementaridade (CDR), como definido por Kabat, J. Immunol., 125, 961-969 (1980);

(2) O aminoácido de anticorpo humano é raro para cadeias pe-

sadas humanas nesta posição, considerando que o aminoácido de murino é comum para cadeias pesadas humanas nesta posição;

(3) A posição é imediatamente adjacente a uma CDR na sequência de aminoácido de cadeia pesada de murino; ou

5 (4) Modelagem tri-dimensional do anticorpo de murino sugere que o aminoácido esteja fisicamente próximo à região de ligação de antígeno.

10 Para selecionar a sequência da cadeia leve humanizada, a sequência de cadeia leve de murino está alinhada com a sequência da cadeia leve de anticorpo humano. O aminoácido de anticorpo humano é selecionado em cada posição para a sequência humanizada, a menos que a posição novamente inclua-se em uma das categorias descritas acima e repetidas abaixo:

- 15 (1) CDR's;  
 (2) aminoácido de murino mais típico do que o anticorpo humano;  
 (3) adjacente a CDR's; ou  
 (4) Proximidade tri-dimensional possível para região de ligação.

20 A sequência de nucleotídeo atual dos genes de cadeia pesada e leve é selecionada como segue:

- (1) O código de sequências de nucleotídeo para as sequências de aminoácido escolhidas como descrito acima;  
 (2) 5' destas sequências de codificação, o código de sequências de nucleotídeo para uma sequência líder (sinal). Estas sequências líder foram escolhidas como típicas de anticorpos;  
 25 (3) 3' das sequências de codificação, as sequências de nucleotídeo são as sequências que seguem o segmento J5 de cadeia leve de camundongo e o segmento J2 de cadeia pesada de camundongo, que são parte da sequência de murino. Estas sequências estão incluídas porque elas  
 30 contêm sinais doador de união; e  
 (4) em cada extremidade da sequência é um sítio de Xba I para permitir cortar nos sítios Xba I e clonar de no sítio Xba I de um vetor.

### Construção de genes de cadeia leve e pesada humanizados

Para sintetizar a cadeia pesada, quatro oligonucleotídeos são sintetizados usando um sintetizador de DNA Applied Biosystems 380B. Dois dos oligonucleotídeos fazem parte de cada filamento da cadeia pesada, e cada oligonucleotídeo sobrepõe o próximo por cerca de 20 nucleotídeos para permitir o recozimento. Juntamente, os oligonucleotídeos revestem a região variável de cadeia pesada humanizada total com alguns nucleotídeos extras em cada extremidade para permitir o corte nos sítios Xba I. Os oligonucleotídeos são purificados a partir de géis de poliacrilamida.

Cada oligonucleotídeo é fosforilado usando ATP e T4 polinucleotídeo cinase por procedimentos padrões (Maniatis e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Para recozer os oligonucleotídeos fosforilados, eles são suspensos juntamente em 40 µl de TA (33 mM de Tris acetato, pH 7,9, 66 mM de acetato de potássio, 10 mM de acetato de magnésio) em uma concentração de cerca de 3,75 µM cada, aquecido a 95°C durante 4 minutos e resfriados lentamente a 4°C. Para sintetizar o gene completo a partir dos oligonucleotídeos sintetizando-se o filamento oposto de cada oligonucleotídeo, os seguintes componentes são adicionados em um volume final de 100 µl:

|           |                                                      |
|-----------|------------------------------------------------------|
| 10 µl     | oligonucleotídeos recozidos                          |
| 0,16 mM   | cada desoxirribonucleotídeo                          |
| 0,5 mM    | ATP                                                  |
| 0,5 mM    | DTT                                                  |
| 100 µg/ml | BSA                                                  |
| 3,5 µg/ml | proteína T4 g43 (DNA polimerase)                     |
| 25 µg/ml  | proteína T4 g44/62 (proteína auxiliar de polimerase) |
| 25 µg/ml  | proteína 45 (proteína auxiliar de polimerase)        |

A mistura é incubada a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, 10 u de T4 DNA ligase são adicionados e a incubação a 37°C é recomeçada durante 30 minutos. A polimerase e ligase são inativadas por incubação da reação a 70°C durante 15 minutos. Para digerir o gene com Xba I, 50 µl de 2

X TA contendo BSA a 200 ug/ml e DTT a 1 mM, 43 ul de água, e 50 u de Xba I em 5 ul são adicionados à reação. A reação é incubada durante 3 horas a 37°C, e em seguida purificada em um gel. O fragmento Xba I é purificado a partir de um gel e clonado no sítio Xba I do plasmídeo pUC19 por métodos padrões. Plasmídeos são purificados usando técnicas padrões e seqüenciados usando o método de didesóxi.

Construção de plasmídeos para expressar cadeias leve e pesada humanizadas é realizada isolando-se os fragmentos de Xba I de cadeia leve e pesada a partir do plasmídeo pUC19 em que foi inserido e em seguida inserindo no sítio Xba I de um vetor de expressão apropriado que expressará níveis altos de uma cadeia pesada completa quando transfectada em uma célula hospedeira apropriada.

#### Síntese e afinidade de anticorpo humanizado

Os vetores de expressão são transfectados em células Sp2/0 de camundongo, e células que integram os plasmídeos são selecionadas na base do(s) marcador(es) selecionável(eis) conferidos pelos vetores de expressão por métodos padrões. Para verificar que este anticorpo segregado de células que liga-se a EfB3, sobrenadantes das células são incubados com células que são conhecidas por expressar EfB3. Depois de lavar, as células são incubadas com anticorpo anti-humano de cabra conjugado de fluoresceína, lavadas, e analisadas quanto à fluorescência em um citofluorômetro de FACSCAN.

Para as próximas experiências, as células que produzem o anticorpo humanizado são injetadas em camundongos, e o ascite resultante é coletado. Anticorpo humanizado é purificado à homogeneidade substancial a partir do ascite por passagem através de uma coluna de afinidade de anticorpo de imunoglobulina anti-humano de cabra, preparado em um suporte de Affigel-10 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.) de acordo com técnicas padrões. A afinidade do anticorpo humanizado relativo ao anticorpo de murino original é determinada de acordo com técnicas conhecidas na técnica.

#### EXEMPLO 8

## ENGENHARIA HUMANA DE ANTICORPOS DE MURINO

Este exemplo descreve a clonagem e expressão de anticorpos Engineered™ Humanos, bem como purificação de tais anticorpos e teste quanto à atividade de ligação.

### 5 Projeto de sequências Human Engineered™

Human Engineering™ de domínios variáveis de anticorpo foi descrito por Studnicka [Veja, por exemplo, Studnicka e outro Patente US No. 5.766.886; Studnicka e outro Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como um método para reduzir a humunogenicidade enquanto mantendo a atividade de ligação de moléculas de anticorpo. De acordo com o método, cada aminoácido de região variável determinou um risco de substituição. Substituições de aminoácido são distintas por uma de três categorias de risco: (1) mudanças de risco baixo são aquelas que têm o maior potencial de reduzir a imunogenicidade com a menor chance de romper a ligação de antígeno; (2) mudanças de risco moderado são aquelas que também reduziram a imunogenicidade, porém tem uma maior chance de afetar a ligação de antígeno ou duplicação de proteína; (3) resíduos de risco alto são aqueles que são importantes para ligar ou manter a estrutura de anticorpo e leva ao risco mais alto em que a ligação de antígeno ou duplicação de proteína será afetada. Devido ao papel estrutural tri-dimensional de prolinas, modificações em prolinas são geralmente consideradas ser pelo menos mudanças de risco moderado, ainda se a posição for tipicamente uma posição de baixo risco. Mudanças substitucionais são realizadas, porém, inserções e deleções são da mesma forma possíveis. A Figura 7 mostra a determinação de risco para cada resíduo de aminoácido de cadeias leve e pesada XPA.04.017.XPA.04.031 e XPA.04.019, categorizadas como uma mudança de risco alto, moderado ou baixo.

Regiões variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo de murino são Human Engineered™ usando este método. Resíduos de aminoácido que são os candidatos para modificação de acordo com o método em posições de baixo risco são identificados alinhando-se as sequências de aminoácido das regiões variáveis de murino com uma sequência de região

variável humana. Qualquer região variável humana pode ser utilizada, incluindo uma sequência de VL ou VH individual ou uma sequência de VL ou VH de consenso humano. Os resíduos de aminoácido em qualquer número das posições de risco baixo, ou em todas as posições de risco de baixo, podem ser mudados.

Similarmente, resíduos de aminoácido que são os candidatos para modificação de acordo com o método em todas as posições de risco moderado e baixo são identificados alinhando-se as sequências de aminoácido das regiões variáveis de murino com uma sequência de região variável humana. Os resíduos de aminoácido em qualquer número das posições de risco baixo ou moderado, ou em todas as posições de risco baixo e moderado, podem ser mudados.

#### Preparação de Vetores de Expressão para Desenvolvimento de Linhagem Celular Permanente

Fragmentos de DNA codificando uma das sequências de região V de cadeia pesada e leve descrita acima juntamente com sequências de sinal derivadas de anticorpo são construídos usando síntese de nucleotídeo sintética. DNA codificando cada uma das sequências de aminoácido de região V de cadeia leve descrita acima é inserido em vetor pMXP10 contendo a região constante de cadeia leve de Capa humana. DNA codificando cada uma das sequências de aminoácido de região V de cadeia pesada descritas acima é inserido em vetor pMXP6 contendo a região constante de cadeia pesada Gama-1, 2, 3 ou 4 humana. Todos estes vetores contêm um promotor de hCMV e uma região não trasladada 3' de cadeia leve de capa bem como genes marcadores selecionáveis tal como *neo* ou *his* para seleção de transfectantes resistentes a G418 - ou histidinol, respectivamente.

#### Preparação de Vetores de Expressão para Expressão Transitória

Vetores contendo genes de cadeia leve ou pesada descritos acima da mesma forma são construídos para transfecção transitória. Estes vetores são similares àqueles descritos acima para transfecções permanentes exceto no lugar de genes *neo* ou *his*, eles contêm o vírus Epstein-Barr oriP para replicação em células HEK293 que expressam o antígeno nuclear

de vírus Epstein-Barr.

Expressão Transitória de Anticorpo anti-EfB3 Criado Humano em Células HEK293E

5 Vetores separados cada qual contendo oriP a partir do Vírus Epstein-Barr e genes de cadeia leve ou cadeia pesada descritos acima são transfectados transitoriamente em células HEK293E. Células transitoriamente transfectadas são permitidas incubar durante até 10 dias depois que o sobrenadante é recuperado e anticorpo purificado usando cromatografia de Proteína A.

10 Desenvolvimento de Células CHO-K1 Permanentemente Transfectadas

Os vetores descritos acima contendo uma cópia cada dos genes leve e pesado são transfectados em células CHO-K1 adaptadas por Ex-Cell 302. Células CHO-K1 adaptadas ao crescimento de suspensão em meio de Ex-Cell 302 são tipicamente eletroporadas com 40 ug de vetor de lineariza-  
15 do. Alternativamente, DNA linearizado pode ser complexado com polietilenoimina linear (PEI) e utilizado para transfecção. As células são semeadas em placas de 96 cavidades contendo meio de Ex-cell 302 suplementado com 1% de FBS e G418. Clones são avaliados em placas de 96 cavidades e o topo ~10% de clones de cada transfecção são transferidos em placas de 24  
20 cavidades contendo meio de Ex-cell 302.

Um teste de produtividade é realizado em placas de 24 cavidades em meio de Ex-cell 302 para crescimento de culturas durante 7 e 14 dias, tempo no qual os sobrenadantes de cultura são testados quanto aos níveis de anticorpo segregado por um ensaio de ELISA de imunoglobulina para IgG.  
25

Os clones do topo são transferidos para agitar frascos contendo meio de Ex-cell 302. Assim que as células são adaptadas em crescimento de suspensão, um teste em frasco de agitação é realizado com estes clones em meio de Ex-cell 302. As células são crescidas durante até 10 dias em  
30 125 ml de frascos de Erlenmeyer contendo 25 ml de meios. Os frascos são abertos pelo menos a cada dois dias do período de incubação para permitir a troca de gás e os níveis de polipeptídeo de imunoglobulina no meio de cul-

tura são determinados por IgG ELISA ao término do período de incubação. Transfecções seqüenciais múltiplas da mesma linhagem celular com dois ou três vetores de transcrição de multi-unidade resulta em clones e linhagens celulares que exibem outros aumentos em níveis de produção de imunoglobulina, preferivelmente para 300 µg/ml ou mais.

#### Purificação

Um processo para a purificação de polipeptídeos de imunoglobulina a partir de vetores e todas as linhagens de acordo com a invenção pode ser designado. Por exemplo, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica, células são removidas por filtração depois do término. O filtrado é carregado em uma coluna de Proteína A (em passagens múltiplas, se necessário). A coluna é lavada e em seguida os polipeptídeos de imunoglobulina expressos e segregados são eluídos a partir da coluna. Para preparação de produto de anticorpo, o *pool* de Proteína A é mantido em um pH baixo (pH 3 durante um mínimo de 30 minutos e um máximo de uma hora) como uma etapa de inativação viral. Uma etapa de troca catiônica absorvente é logo utilizada para também purificar o produto. O eluído da coluna de separação absorvente é passado através de um vírus que retém o filtro para fornecer outra liberação de partículas virais potenciais. O filtrado é também purificado passando-se através de uma coluna de troca de ânion em que o produto não liga. Finalmente, o processo de purificação é concluído transferindo-se o produto no tampão de formulação através de diafiltração. O retentado é ajustado em uma concentração de proteína de pelo menos 1 mg/mL e um estabilizador é adicionado.

#### Atividade de ligação

A atividade de ligação de EphB3 dos anticorpos Human Engineered™ recombinantes. Proteína é purificada a partir de sobrenadantes de cultura de frasco de agitação por passagem durante uma coluna de proteína. A coluna seguida por determinação de concentração por  $A_{280}$ . Ensaio de ligação são realizados como descrito em outros exemplos.

#### EXEMPLO 9

#### SEQUÊNCIAS

cgtgagcggcgagcagcaagatcccagctcggaccccgagggcgcgcgccccgaagccccggatcc  
cagtcggggccgcagctgaccgccagattactgtgcatcccgaatcacgaccacctgcacctctctgccc  
cggcccgccccccaagtctcaggcaccagctccccggcgccccggatcctcctggaccgggtccgtcc  
5 agattcccgcgggaccgacctgtccgcaccccaggaccgcccgggctcgggtgcaccgcctcgggtcccg  
agccgcccgcctggattgcattccctcctctcctggatctcctgggacccgacgcgagcctgccccggagc  
ccgcccagcgcacccctctctcgggtgcctgcagccccgcccggcgcgccccggccggcgcgccccgg  
ctcgggtcctagagctgccacggccatggccagagcccggcccggccgcccgtcgcggccgcccgg  
ggcttctgcgcgtgctccctccgctgctgctgctgcccgtgctgctgcccggcggtgcggggcgctgg  
10 aagagaccctcatggacacaaaatgggtaacatctgagtggcggtggacatctcatccagaaagtgggtg  
ggaagagggtgagtggctacgatgaggccatgaatcccatccgcacataccaggtgtgtaatgtgcgcga  
gtcaagccagaacaactggcttcgcacggggttcacatctggcgggcggtatgtgcagcgggtctacgtga  
gctcaagttcactgtgcgtgactgcaacagcatccccaacatccccggctcctgcaaggagaccttaac  
ctcttctactacgaggctgacagcgatgtggcctcagcctcctcccccttctggatggagaacccctacgtg  
15 aaagtggacaccattgcacccgatgagagcttctcgcggctggatgccggccgtgtcaacaccaagggtg  
cgcagctttgggccactttccaaggctggcttctacctggccttcaggaccagggcgccctgcatgtcgctc  
atctccgtgcgcgccttctacaagaagtgtgcatccaccaccgcaggcttcgcactcttccccgagaccctc  
actggggcgggagcccacctcgctggtcattgctcctggcacctgcatccctaacgccgtggagggtgcggt  
gccactcaagctctactgcaacggcgatggggagtggatgggtgcctgtgggtgcctgcacctgtgccacc  
20 ggccatgagccagctgccaaggagtcccagtgccgccccctgtccccctgggagctacaaggcgaagca  
gggagagggggccctgcctcccatgtcccccaacagccgtaccacctcccagccgcccagcatctgca  
cctgccacaataacttctaccgtgcagactcggactctgcggacagtgctgtaccaccgtgccatctcca  
ccccgaggtgtgatctccaatgtgaatgaaacctcactgatcctcgagtggagtgcagccccgggacctgg  
gtggccgggatgacctcctgtacaatgtcatctgcaagaagtgccatggggctggagggggcctcagcctg  
25 ctacgctgtgatgacaacgtggagtttgcctcggcagctgggcctgacggagcgccgggtccacatc  
agccatctgctggcccacacgcgctacacctttgaggtgcaggcggtcaacggtgtctcgggcaagagc  
cctctgccgcctcgttatgcggccgtgaatatcaccacaaaccagggtgccccgtctgaagtgccacact  
acgcctgcacagcagctcaggcagcagcctcacctatcctgggcacccccagagcggcccaacgga  
gtcatcctggactacgagatgaagtactttgagaagagcgagggcatgcctccacagtgaccagccag  
30 atgaactccgtgcagctggacgggcttcggcctgacgcccgtatgtggtccagggtccgtgcccgcacagt  
agctggctatgggcagtagccgcctgccgagtttgagaccacaagtgcagagggctctggggccca  
gcagctccaggagcagcttccctcatcggtgggctccgctacagctgggcttgccttcgtgggtgctgctg

MARARPPPPSPPPGLPLPPLLLLPLLLLPAGCRALEETLMDTKWVTSEL

AWTSHPESGWEEVSGYDEAMNPIRTYQVCNVRESSQNNWLRTGFIWRRD  
 VQRVYVELKFTVRDCNSIPNIPGSKETFNLFYYEADSDVASASSPFWMEN  
 PYVKVDTIAPDESFSRLDAGRVNTKVRSGPLSKAGFYLAHQDQGACMSLI  
 SVRAFYKKCASTTAGFALFPETLTGAEPSTLVIAPGTCIPNAVEVSVPLKLYC  
 5 NGDGEWMVPVGACTCATGHEPAAKESQCRPCPPGSYKAKQGEGPCLPC  
 PPNSTRTTSPAASICTCHNNFYRADSDSADSACTTVPSPPRGVISNVNETSLI  
 LEWSEPRDLGGRDDLLYNVICKKCHGAGGASACSRCDNVEFVPRQLGLT  
 ERRVHISHLLAHTRYTFEVQAVNGVSGKSPLPPRYAAVNITTNQAAPSEVPT  
 LRLHSSSGSSLTSLWAPPERPNGVILDYEMKYFEKSEGIASVTTSQMNSVQ  
 10 LDGLRPDARYVVQVRARTVAGYGQYSRPAEFETTSERGSGAQQQLQEQLPL  
 IVGSATAGLVFVAVVIAIVCLRKQRHGSSEYTEKLQQYIAPGMKVYIDPF  
 TYEDPNEAVREFAKEIDVSCVKIEEVIGAGEFGEVCRGRLKQPGRREVFVAI  
 KTLKVGYTEQRDRDLSEASIMGQFDHPNIIRLEGVVTKSQPMILTEFMEN  
 CALDSFLRLNDGQFTVIQLVGMLRGIAAGMKYLSEMNYVHRDLAARNILVN  
 15 SNLVCKVSDFGLSRFLEDDPSDPTYTSSLGGKIPRWTAPAEIAYRKFTSAS  
 DVWSYGIVMWEVMSYGERPYWDMSNQDVINAVEQDYRLPPPMDCPTALH  
 QLMLDCWVRDRNLRPKFSQIVNTLDKLIRNAASLKVIASASGMSQPLDR  
 TVPDYTTFTTVGDWLDAIKMGYKESFVSAGFASFDLVAQMTAEDLLRIGV  
 TLAGHQKKILSSIQDMRLQMNQTLPVQV

20 Todas as patentes U.S. acima, publicações de pedido de patente  
 U.S., pedidos de patente U.S., patentes estrangeiras, pedidos de patente  
 estrangeira e publicações de não patente referidas nesta especificação e/ou  
 listadas na Folha de Dados de Pedido, estão incorporados aqui por referên-  
 cia, em sua totalidade.

25 A partir das anteriores será evidenciado que, embora as modali-  
 dades específicas da invenção tenham sido descritas aqui para propósitos  
 de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem divergir-se do espíri-  
 to e escopo da invenção.

## RESUMO

Patente de Invenção: "ANTICORPOS ANTAGONÍSTICOS CONTRA E-PHB3".

- 5 Anticorpos específicos de EphB3 são fornecidos, junto com composições farmacêuticas contendo tal anticorpo, *kits* contendo uma composição farmacêutica, e métodos de prevenir e tratar um distúrbio ou doença relacionado a EphB3.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo de antagonista que liga o domínio extracelular de EphB3 com uma afinidade ( $K_D$ ) de  $10^{-6}$  M ou menor e compete com quaisquer dos anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019 para ligar-se em EphB3 por mais de 75%.  
5
2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que liga-se ao mesmo epítipo de EphB3 como quaisquer dos anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019.  
10
3. Anticorpo, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo de antagonista que compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de quaisquer dos anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019.  
15
4. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo construído humano, um anticorpo humano, um anticorpo de cadeia simples ou um fragmento de anticorpo.  
20
5. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos um aminoácido dentro de uma CDR é substituído por um resíduo correspondente de uma CDR correspondente de outro anticorpo anti-EphB3.  
25
6. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que um ou dois aminoácidos dentro de uma CDR foram modificados.  
30
7. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que mantém pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% de identidade sobre a região pesada ou leve variável para os anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019.  
35
8. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região constante de uma sequência de anticorpo humana e uma ou mais regiões de estrutura variável de cadeia pesada e leve de uma sequência de anticorpo humana.  
40

9. Anticorpo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a seqüência de anticorpo humana é uma seqüência humana individual, uma seqüência de consenso humana, uma seqüência de linha germinativa humana individual, ou uma seqüência de linha germinativa de consenso humana.

10. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a região constante de cadeia pesada é um IgG, IgM, IgA, IgD, IgE modificado ou não modificado, um fragmento dos mesmos, ou combinações dos mesmos.

11. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que têm uma afinidade de ligação de  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ou  $10^{-9}$  M ou menor para EphB3.

12. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que compreende uma substituição conservadora nas CDRs.

13. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende uma mudança conservadora ou não conservadora nos resíduos de risco baixo e moderado.

14. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a região constante de cadeia leve é uma região constante de cadeia leve de lambda modificada ou não modificada, uma região constante de cadeia leve de capa, um fragmento dos mesmos, ou combinações dos mesmos.

15. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que inibe a fosforilação de EphB3.

16. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que inibe a dimerização de EphB3.

17. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que inibe ativação de receptor induzida por ligante de EphB3.

18. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que inibe a sinalização de EphB3.

19. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que inibe a ligação de ephrinB2 a EphB3.

20. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que inibe a ligação de ephrinB1 a EphB3.

5 21. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que inibe a ligação de ephrinB3 a EphB3.

22. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que inibe a proliferação de uma célula intestinal.

10 23. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que inibe a proliferação de uma célula vascular.

15 24. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que promove a proliferação de uma célula neuronal.

25. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que é conjugado a outro agente diagnóstico ou terapêutico.

20 26. Método de avaliar um anticorpo de antagonista ao domínio extracelular de uma proteína de EphB3 útil para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionada a EphB3, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

25 contatar um polipeptídeo que compreende o ECD de EphB3 com um anticorpo candidato que contém pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de anticorpos XPA.04.017, XPA.04.031, ou XPA.04.019;

detectar a afinidade de ligação do anticorpo candidato ao polipeptídeo, e

30 identificar o referido anticorpo candidato como um anticorpo útil para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionado a EphB3 se uma afinidade de ligação de pelo menos  $10^{-6}$  M for detectada.

25. Método de alterar anticorpos de antagonista sistematicamente e avaliar um anticorpo de antagonista ao domínio extracelular de uma pro-

teína de EphB3 útil para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionado a EphB3, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

preparar um anticorpo candidato que contém modificações em um ou dois aminoácidos dentro das CDRs de anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019,

contatar um polipeptídeo que compreende o ECD de EphB3 com o referido anticorpo candidato

detectar a afinidade de ligação do anticorpo candidato ao polipeptídeo, e

identificar o referido anticorpo candidato como um anticorpo útil para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionado a EphB3 se uma afinidade de ligação de pelo menos  $10^{-6}$  M for detectada.

26. Método de avaliar um anticorpo de antagonista ao domínio extracelular de uma proteína de EphB3 útil para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionado a EphB3, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

contatar uma célula com um anticorpo candidato que contém pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de anticorpos XPA.04.017, XHA.05.172, XHA.05.849, XPA.04.031, ou XPA.04.019 ou um anticorpo que contém uma modificação de um ou dois aminoácidos dentro de uma ou mais CDRs;

detectar a proliferação ou sobrevivência da referida célula; e

identificar o referido anticorpo candidato como um anticorpo útil para o tratamento de um distúrbio ou doença relacionado a EphB3 se uma diminuição ou aumento na proliferação de célula ou sobrevivência for detectada.

27. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser para preparação de uma composição farmacêutica utilizável no tratamento de um indivíduo sofrendo de uma doença coeliaca.

28. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica utili-

zável no tratamento de indivíduo sofrendo de uma doença angiogênica.

29. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica utilizável no tratamento de um indivíduo sofrendo de uma lesão neuronal.

30. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica utilizável no tratamento de indivíduo sofrendo de uma doença neurodegenerativa.

31. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, conjugado a outro agente terapêutico, caracterizado pelo fato de ser para preparação de uma composição farmacêutica utilizável para alvejar uma célula que expressa EphB3.

32. Uso de acordo com as reivindicações 27 a 31, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um mamífero.

33. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um humano.

34. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica a cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo, como definido em qualquer uma reivindicações 1 a 23.

35. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico, como definida na reivindicação 34, operavelmente ligada a uma seqüência de controle reguladora.

36. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, como definido na reivindicação 35, ou uma molécula de ácido nucléico, como definida na reivindicação 48.

37. Método de usar a célula hospedeira, como definida na reivindicação 36, para produzir um anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira de acordo com a reivindicação 36,

sob condições adequadas e recuperar o referido anticorpo.

38. Anticorpo, caracterizado pelo fato de ser produzido pelo método como definido na reivindicação 37.

5 39. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23 ou 38, caracterizado pelo fato de que é purificado em pelo menos 95% de homogeneidade em peso.

40. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido na reivindicação 39, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

10 41. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, 38 e 39, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo da invenção, empacotado em um recipiente, o referido *kit* opcionalmente contendo um segundo agente terapêutico, e também compreendendo um  
15 rótulo ligado a ou empacotado com o recipiente, o rótulo descrevendo os teores do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções com respeito ao uso dos teores do recipiente para tratar um distúrbio ou doença relacionado a EphB3.

20 42. Kit de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o recipiente é um frascote ou frasco ou seringa preenchida.