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

(11) PI 0923231-1 B1

(22) Data do Depósito: 02/12/2009

(45) Data de Concessão: 28/04/2020

(54) Título: ANTICORPO ANTI-CMET, COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE, E USOS DO ANTICORPO E DA COMPOSIÇÃO.

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

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2008 IB PCT/IB2008/055663; 05/06/2009 US 61/184.502.

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

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

(86) Pedido PCT: PCT EP2009066201 de 02/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/069765 de 24/06/2010

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

(57) Resumo: ANTICORPO ANTI-cMET, COMPOSIÇÃO QUE O COMPREENDE, E USOS DO ANTICORPO E DA COMPOSIÇÃO A presente invenção refere-se a um anticorpo capaz de se ligar especificamente ao receptor c-Met humano e/ou capaz de inibir especificamente a atividade de tirosina cinase do dito receptor, com uma atividade antagonística aperfeiçoada, o dito anticorpo compreendendo uma região de dobra modificada. Uma composição compreeendendo tal antagonista de anticorpo para c-Met e seu uso como um medicamento para tratamento de câncer.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPO ANTI-cMET, COMPOSIÇÃO QUE O COMPREENDE, E USOS DO ANTICORPO E DA COMPOSIÇÃO".**

[0001] A presente invenção refere-se a um anticorpo divalente capaz de se ligar especificamente ao receptor c-Met humano e/ou capaz de inibir especificamente a atividade da tirosina cinase do dito receptor, bem como às sequências de aminoácido e ácido nucleico codificando o dito anticorpo. Mais particularmente, o anticorpo de acordo com a invenção é capaz de inibir a dimerização de c-Met. A invenção compreende da mesma maneira o uso do dito anticorpo como um medicamento para o tratamento profilático e/ou terapêutico de cânceres ou qualquer patologia ligada à superexpressão dos ditos receptores bem como em processos ou estojos para diagnóstico de doenças ligadas com a superexpressão de c-Met. A invenção compreende finalmente produtos e/ou composições compreendendo tal anticorpo em combinação com outros anticorpos e/ou compostos químicos direcionados contra outros fatores de crescimento envolvidos em progressão ou metástase de tumor e/ou compostos e/ou agentes anticâncer ou agentes conjugados com toxinas e seu uso para a prevenção e/ou tratamento de certos cânceres.

[0002] Agentes direcionados ao receptor tirosina cinase (RTK) tais como trastuzumabe, cetuximabe, bevacizumabe, imatinibe e gefitinibe têm mostrado o interesse de direcionamento desta classe de proteína para tratamento de cânceres selecionados.

[0003] c-Met é o membro prototípico de uma subfamília de RTKs, que também inclui RON e SEA. A família RTK de c-Met é estruturalmente diferente de outras famílias RTK e é o único receptor de alta afinidade conhecido para fator de crescimento de hepatócito (HGF), também chamado fator de espalhamento (SF) [D.P. Bottaro et. al, *Science* 1991, 251:802-804; L. Naldini *et. al., Eur. Mol. Biol. Org. J.*, 1991,

10:2867-2878]. c-Met e HGF são amplamente expressos em uma variedade de tecido e sua expressão é normalmente restrita a células de origem epitelial e mesenquimal respectivamente [M.F. Di Renzo et. al., *Oncogene*, 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et. al., *J. Cell. Blol.*, 1993, 123:223-235]. Eles são ambos requeridos para desenvolvimento de mamífero normal e mostraram ser particularmente importantes em migração celular, diferenciação morfogênica e organização das estruturas tubulares tridimensionais bem como crescimento e angiogênese [F. Baldt et. al., *Nature*, 1995, 376:768-771]; C. Schmidt *et. al., Nature,* 1995:373:699-702; Tsarfaty *et. al., Science,* 1994, 263:98-101]. Embora a regulagem controlada de c-Met e HGF tenha sido mostrada ser importante em desenvolvimento, manutenção de tecido e reparo em mamífero [Nagayama T., Nagayama, M., Kohara, S., Kamiguchi, H., Shibuya, M., Katoh, Y., Itoh, J., Shinohara, Y., *Brain Res.* 2004, 5;999 (2):156-66; Tahara, Y., Ido, A., Yamamoto, S., Miyata, Y., Uto, H., Hori, T., Hayashi, K., Tsubouchi, H., *J. Pharmacol Exp. Ther.* 2003, 307(1): 146-51], sua desregulagem está implicada na progressão de cânceres.

[0004] Sinalização aberrante dirigida por ativação inapropriada de c-Met é uma das alterações mais frequentes observadas em cânceres humanos e desempenha um papel crucial em tumorigênese e metástase [Birchmeier *et. al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4:915-925; L. Trusolino e Comoglio, P. M., *Nat. Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].

[0005] Ativação de c-Met inapropriada pode surgir através de mecanismos dependentes e independentes de ligante, que incluem superexpressão de c-Met, e/ou ativação parácrina ou autócrina, ou através de ganho em mutação de função [J.G. Christensen, Burrows, J. e Salgia, R., *Cancer Latters*, 2005, 226:1-26]. No entanto, uma oligomerização de receptor c-Met, na presença ou ausência do ligante, é requerida para regular a afinidade de ligação e cinética de ligação da cinase com relação a ATP e substratos de peptídeo contendo tirosina [Hays,

J.L., Watowich, S.J., *Biochemistry,* 17 de agosto de 2007, 43:10570-8]. c-Met ativado recruta efetores de sinalização para seu sítio de multiancoragem localizado no domínio do citoplasma, resultando na ativação de vários cursos de sinalização-chave, incluindo Ras-MAPK, Ras-MAPK, PI3K, Src e Stat3 [Gao, C.F., Vande Woude, G.F., *Cell Res.* 2005, 15(1):49-51; Furge, K.A., Zhang, Y.W., Vande Woude, G.F., *Oncogene*. 2000, 19(49):5582-9]. Estes cursos são essenciais para proliferação, invasão e angiogênese de célula de tumor e para evitar apoptose [Furge, K.A., Zhang, Y.W., Vande Woude, G.F., *Oncogene*, 2000, 19(49):5582-9; Gu, H., Neel, B.G., *Trends Cell Biol.* Março de 2003, 13(3): 122-30; Fan S., Ma, Y.X., Wang, J.A., Yuan, R.Q., Meng Q., Cao, Y., Laterra, J.J., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., *Oncogene.* 27 de abril de 2000, 19(18):2212-23]. Ainda, uma faceta única da sinalização de c-Met com relação a outras RTK é sua interação relatada com complexos de adesão focal e contrapartes de ligação não cinase tais como α6β4 integrinas [Trusolino L., Bertotti A., Comoglio, P.M., *Cell,* 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R., Taher, T.E., Wielenga, V.J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E., Pals, S.T., *J. Biol. Chem*. 1999, 274(10):6499-506], Plexina B1 ou semaforinas [Giordano S., Corso S., Conrotto P., Artigiani S., Gilestro G., Barberis D., Tamagnone L., Comoglio PM, *Nat Cell Biol*. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P., Valdembri D., Corso, S., Serini G., Tamagnone L., Comoglio, P.M., Bussolino F., Giordano S., *Blood*. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P., Corso S., Gamberini S., Comoglio, P.M., Giordano S., *Oncogene*. 2004, 23:5131-7] que pode ainda agregar a complexidade de regulagem de função celular por este receptor. Finalmente, dados recentes demonstram que c-Met poderia estar envolvido em resistência de tumor a gefitinite ou erlotinibe sugerindo que combinação de composto se direcionando a ambos o EGFR e o c-Met poderia ser de interesse significante [Engelman, J.A. et. al., *Science*,

2007, 316:1039-43].

[0006] Nos últimos anos, muitas estratégias diferentes foram desenvolvidas para atenuar a sinalização de c-Met em linhagens de célula de câncer. Estas estratégias incluem i) neutralização de anticorpos contra c-Met ou HGF/SF [Cao B., Su Y., Oskarsson M., Zhao P., Kort, E.J., Fisher, R.J., Wang, L.M., Vande Woude, G.F., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98(13):7443-8; Martens, T., Schmidt, N.O., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Merchant, M., Schwall ,R., Westphal, M., Lamszus, K., *Clin Cancer Res*. 2006, 12(20):6144-52] ou o uso de antagonista de HGF/SF NK4 para prevenir ligação de ligante a c-Met [Kuba, K., Matsumoto, K., Date, K., Shimura, H., Tanaka, M., Nakamura, T., *Cancer Res*., 2000, 60:6737-43], ii) inibidores de sítio de ligação de ATP pequenos para c-Met que bloqueiam a atividade de cinase [Christensen, J.G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le P., Chen, J., Wang, X., Ruslim, L., Blake, R., Lipson, K.E., Ramphal, J., Do, S., Cui J.J., Cherrington, J.M., Mendel, D.B., *Cancer Res.* 2003, 63:7345-55], iii) e polipeptídeo de domínio SH2 engenheirado que interfere com acesso ao sítio de multiancoragem e RNai ou ribozima que reduz expressão de receptor ou ligante. A maioria dessas abordagens mostra uma inibição seletiva de c-Met resultando em inibição de tumor e mostrando que c-Met poderia ser de interesse para intervenção terapêutica em câncer.

[0007] Dentre as moléculas geradas para direcionamento a c-Met, algumas são anticorpos. O mais extensivamente descrito é o anticorpo anti-c-Met 5D5 gerado pela Genentech [WO 96/38557] que se comporta como um agonista potente quando adicionado sozinho em vários modelos e como um antagonista quando usado como um fragmento Fab. Uma forma engenheirada monovalente deste anticorpo descrita como um 5D5 armado (OA5D5) e produzida como uma proteína recombinante em *E. coli* é também o objeto de um Pedido de Patente

[WO 2006/015371] da Genentech. No entanto, esta molécula que poderia ser considerada como um anticorpo por causa de sua base particular mostra também mutações que poderiam ser imunogênicas em humanos. Em termos de atividade, esta molécula não glicosilada é destituída de funções efetoras e, finalmente, quaisquer dados claros demonstram que OA5D5 inibe dimerização de c-Met. Além disto, quando testado no modelo *in vivo* G55, uma linhagem de célula glioblastoma que expressa c-Met, mas não mRNA de HGF e proteína e que cresce independentemente do ligante, o anti-c-Met armado não teve nenhum efeito significante sobre crescimento de tumor G55 sugerindo que OA5D5 age principalmente através de bloqueio de ligação de HGF e não é capaz de se direcionar a tumores ativados independentemente de HGF [Martens, T. *et. al., Clin. Cancer Res.*, 2006, 12(20):6144-6152].

[0008] Outro anticorpo se direcionando a c-Met é descrito pela Pfizer como um anticorpo que age "predominantemente como antagonista de c-Met, e em alguns casos como um agonista de c-Met" [WO 2005/016382]. Nenhum dado mostrando qualquer efeito de anticorpos Pfizer sobre dimerização de c-Met é descrito neste pedido.

[0009] Um dos aspectos inovadores da presente invenção é gerar um anticorpo monoclonal quimérico e/ou humanizado sem atividade agonista intrínseca e inibindo de dimerização de c-Met. Mais particularmente, um aspecto inovador da presente invenção é gerar um anticorpo monoclonal quimérico e/ou humanizado com atividade antagonista e inibindo dimerização de c-Met.

[0010] Em adição a direcionamento a tumores dependentes de ligante, esta abordagem vai também prejudicar ativações independentes de ligante de c-Met devido à sua superexpressão ou mutações dos domínios intracelulares que permaneceram dependentes de oligomerização para sinalização. Outro aspecto da atividade deste anticorpo

poderia ser um impedimento estérico para interação de c-Met com suas contrapartes que vai resultar em prejuízo das funções de c-Met. Este anticorpo é humanizado e engenheirado preferivelmente, mas não limitado, como IgG1 humano para dar funções efetoras tais como ADCC e CDC em adição às funções ligadas ao bloqueio específico do receptor c-Met.

[0011] Surpreendentemente, pela primeira vez, os inventores tentaram gerar um anticorpo antagonista monoclonal quimérico e/ou humanizado capaz de ligação a c-Met, mas também capaz de inibição da dimerização de c-Met, o dito anticorpo monoclonal sendo divalente contrário a anticorpos antagonistas existentes direcionados contra c-Met. Ser for verdade que, na técnica anterior, é algumas vezes sugerido que um anticorpo capaz de inibição da dimerização de c-Met com suas contrapartes poderia ser interessante, nunca foi revelado, ou claramente sugerido, um anticorpo capaz de fazer tal coisa. Além disto, com relação à especificidade de anticorpo, não foi evidente de maneira alguma ter havido sucesso na geração de tal anticorpo divalente ativo.

[0012] Como foi explicado antes, a inibição da dimerização de c-Met é um aspecto essencial da invenção uma vez que tais anticorpos vão apresentar um interesse real para uma população maior de pacientes. Não apenas câncer por c-Met ativado dependente de ligante, como era o caso até a presente invenção, mas também câncer por c-Met ativado independente de ligante poderia ser tratado com anticorpos gerados através do processo da presente invenção.

[0013] Os anticorpos foram avaliados através de análise BRET em células expressando ambos os c-Met-RLuc/c-Met-YFP e selecionados quanto à sua habilidade em inibir pelo menos 40%, preferivelmente 45%, 50%, 55% e mais preferivelmente 60%, do sinal de BRET.

[0014] A tecnologia BRET é conhecida como sendo representativa da dimerização de proteína [Angers *et. al., PNAS*, 2000, 97:3684-89].

[0015] A tecnologia BRET é bem conhecida pelo versado na técnica e será detalhada nos exemplos que seguem. Mais particularmente, BRET (Transferência de Energia por Ressonância com Bioluminescência) (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) é uma transferência de energia não radiativa ocorrendo entre um doador bioluminescente (Renila Luciferase (Rluc)) e um aceitador fluorescente, um mutante de GFP (Proteína Verde Fluorescente) (*Green Fluorescente Protein*) ou YFP (proteína amarela fluorescente) (*Yellow Fluorescent Protein*). No presente caso EYFP (Proteína Fluorescente Amarela Aumentada) (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) foi usada. A eficácia de transferência depende da orientação e da distância entre o doador e o aceitador. Então, a transferência de energia pode ocorrer apenas se as duas moléculas estiverem em proximidade grande (1-10 nm). Esta propriedade é usada para gerar ensaios de interação proteína-proteína. Na verdade, a fim de estudar a interação entre dois contrapartes, o primeiro é geneticamente fundido à Renila Luciferase e o segundo ao mutante amarelo da GFP. Proteínas de fusão são geralmente, mas não obrigatoriamente, expressas em células de mamífero. Na presença de seu substrato permeável de membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Se o mutante de GFP estiver mais próximo do que 10 nm da Rluc, uma transferência de energia pode ocorrer e um sinal amarelo adicional pode ser detectado. O sinal BRET é medido como a razão entre a luz emitida pelo aceitador e a luz emitida pelo doador. Então o sinal BRET vai aumentar conforme as duas proteínas de fusão são aproximadas ou se uma mudança conformacional aproximar Rluc e mutante de GFP.

[0016] Se a análise BRET consistir em uma modalidade preferida, qualquer método conhecido pelo versado na técnica pode ser usado para medir dimerização de c-Met. Sem limitação, as tecnologias que seguem podem ser mencionadas: FRET (Transferência de Energia por

Ressonância com Fluorescência) (*Fluorescence Resonance Energy Transfer)*, HTRF (Fluorescência Resolvida no Tempo Homogênea) (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*), FLIM (Microscopia de Imagem de Tempo de Vida com Fluorescência) (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) ou SW-FCCS (Espectroscopia de Correlação Cruzada com Fluorescência de Comprimento de Onda Único) (*Single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy*).

[0017] Outras tecnologias clássicas poderiam ser também usadas, tais como coimunoprecipitação, avaliação Alfa, reticulação química, Híbrido Duplo, Cromatografia por Afinidade, ELISA ou *Far western blot.*

[0018] Os termos "anticorpo", "anticorpos" e "imunoglobulina" são usados intercomutavelmente no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais de comprimento integral ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes ou anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada).

[0019] Mais particularmente, tal molécula consiste em uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (ou domínio) (abreviada aqui como HCVR ou VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como LCVR ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas mais em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), interespaçadas com regiões que são mais conservadas, cha-

madas regiões de estrutura principal (FR). Cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino ao terminal carbóxi na ordem que segue: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

[0020] As cadeias pesadas de imunoglobulinas podem ser divididas em três regiões funcionais: região Fd, a região de dobra, e a região Fc (fragmento cristalizável). A região Fd compreende os domínios VH e CHI e, em combinação com a cadeia leve, forma Fab – o fragmento de ligação a antígeno. O fragmento Fc é responsável pelas funções efetoras da imunoglobulina, que incluem, por exemplo, fixação de complemento e ligação a receptores de Fc cognatos de células efetoras. A região de dobra, encontrada nas classes de imunoglobulina IgG, IgA e IgD, age como um espaçador flexível que permite que a porção Fab se mova livremente no espaço com relação à região Fc. Os domínios de dobra são estruturalmente diversos, variando em ambos a sequência e o comprimento dentre as classes e subclasses de imunoglobulina.

[0021] De acordo com estudos cristalográficos, a região de dobra de imunoglobulina pode ser subdividida mais estruturalmente e funcionalmente em três regiões: a dobra superior, o núcleo e a dobra inferior (Shin *et. al.*, *Immunological Reviews* 130:87, 1992). A dobra superior inclui aminoácidos da extremidade carboxila de CHI para o primeiro resíduo na dobra que restringe movimento, geralmente o primeiro resíduo cisteína que forma uma ligação dissulfeto intercadeia entre as duas cadeias pesadas. O comprimento da região de dobra superior se

relaciona com flexibilidade segmental do anticorpo. A região de dobra do núcleo contém as pontes dissulfeto intercadeia pesada. A região de dobra inferior une a extremidade amino terminal do, e inclui resíduos no, domínio CH2. A região de dobra de núcleo de IgG1 humana contém a sequência Cys-Pro-Pro-Cys que, quando dimerizada pela formação de ligação dissulfeto, resulta em um octapeptídeo cíclico acreditado agir como um pivô, então conferindo flexibilidade. Mudanças conformacionais permitidas pela estrutura e flexibilidade da sequência de polipeptídeo da região de dobra de imunoglobulina podem afetar as funções efetoras da porção Fc do anticorpo.

[0022] O termo «Anticorpo Monoclonal» é usado de acordo com seu significado comum para denotar um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto pelas mutações de ocorrência natural possível que podem estar presentes em quantidades menores. Em outras palavras, um anticorpo monoclonal consiste em um anticorpo homogêneo resultante da proliferação de um clone único de células (por exemplo, células de hibridoma, células hospedeiro eucarióticas transfectadas com DNA codificando o anticorpo homogêneo, células hospedeiro procarióticas transformadas com DNA codificando o anticorpo homogêneo, etc) e que é geralmente caracterizado por cadeias pesadas de classe e subclasse únicas e cadeias leves de um tipo único. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um antígeno único. Ainda, em contraste com preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente anticorpos diferentes direcionados contra determinantes diferentes, ou epítopo, cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um determinante único no antígeno.

[0023] No presente relatório, os termos polipeptídeos, sequências de polipeptídeo, sequências de aminoácido, peptídeos e proteínas ligados a

compostos de anticorpo ou à sua sequência são intercomutáveis.

[0024] A invenção refere-se a um anticorpo monoclonal, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, capaz de inibir a dimerização de c-Met e compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s: 1, 2 e 3 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID N°s: 1, 2 e 3; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s: 5, 6 e 7 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com sequência SEQ ID N°: 5, 6 ou 7, o dito anticorpo sendo caracterizado ainda pelo fato de também compreender uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°: 56.

[0025] Mais particularmente, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, conforme acima descrito caracterizado pelo fato de compreender também uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°: 57.

[0026] Em outras palavras, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, capaz de inibir a dimerização de c-Met e compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s: 1, 2 e 3 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID N°s: 1, 2 e 3; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s: 5, 6 e 7 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID N°s: 5, 6 e 7, o dito anticorpo sendo ainda caracterizado pelo fato

de também compreender uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°: 57.

[0027] Mais particularmente, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, conforme acima descrito caracterizado pelo fato de também compreender uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°: 21.

[0028] Em outras palavras, a invenção refere-se também a um anticorpo monoclonal, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, capaz de inibir a dimerização de c-Met e compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s: 1, 2 e 3 ou uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID N°s: 1, 2 e 3; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s: 5, 6 e 7 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID N°s: 5, 6 e 7, o dito anticorpo sendo caracterizado ainda pelo fato de também compreender uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido N° 21.

[0029] Como será aparente para o versado na técnica, as sequências de consenso SEQ ID N°s: 57 e 21 estão compreendidas na sequência de consenso SEQ ID N°: 56.

Tabela 1

	N° 01	N° 02	N° 03	N° 04	N° 05	N° 06	N° 07	N° 08	N° 09	N°10	N° 11	N° 12	N° 13	N° 14
SEQ ID N°:56	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	X11	X12	C	X14
SEQ ID N°:57	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	P	P	C	P
SEQ ID N°:21	X1	X2	X3	C	X5	-	C	X8	X9	C	X11	X12	C	X14

[0030] Para SEQ ID N°: 56:

X1: P, R, C, - X5: D, C, G, - X8: H, V, K, - X12: P, -
X2: K, C, R, - X6: K, C, - X9: T, C, E, P, - X14: P, T
X3: S, C, D, - X7: T, C, - X11: P, I

[0031] A expressão "fragmentos e derivados funcionais" será definida em detalhes mais tarde no presente pedido.

[0032] Com regiões CDR ou CDR(s) é pretendido indicar as regiões hipervariáveis das cadeias pesada e leve das imunoglobulinas conforme definido por IMGT.

[0033] A numeração IMGT única foi definida para comparar os domínios variáveis qualquer que seja o receptor de antígeno, o tipo de cadeia ou a espécie [Lefranc, M.P., *Immunology Today,* 18, 509 (1997); Lefranc, M.P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. e Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.,* 27, 55-77 (2003)]. Na numeração única IMGT, os aminoácidos conservados sempre têm a mesma posição, por exemplo, cisteína 23 (1ª-CYS), triptofano 41 (TRP-CONSERVADO), aminoácido 89 hidrofóbico, cisteína 104 (2ª-CYS), fenilalanina ou triptofano 118 (J-PHE ou J-TRP). A numeração única IMGT provê uma delimitação padrão das regiões de estrutura principal (FR1-IMGT: posições 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 e FR4-IMGT: 118 a 128) e das regiões de determinação de complementaridade: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 e CDR3-IMGT: 105 a 117. Como lacunas representam posições não ocupadas, os comprimentos de CDR-IMGT (mostrados entre colchetes e separados por pontos, por exemplo, [8.8.13]) se tornam informação crucial. A numeração única IMGT é usada em representações gráficas 2D, chamadas IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. e Lefranc, M.P., *Immunogenetics,* 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. e Lefranc, M.P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)] e em estruturas 3D em IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. e Lefranc, M.P., "T cell re-

ceptor and MHC structural data". *Nucl. Acids Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

[0034] Três CDRs de cadeia pesada e 3 CDRs de cadeia leve existem. O termo CDR ou CDRs é usado aqui a fim de indicar, de acordo com o caso, uma dessas regiões ou várias, ou até mesmo todas, dessas regiões que contêm a maioria dos resíduos de aminoácido responsáveis pela ligação por afinidade do anticorpo ao antígeno ou o epítopo que ele reconhece.

[0035] Com "porcentagem de identidade" entre duas sequências de ácido nucleico ou aminoácido no sentido da presente invenção é pretendido indicar uma porcentagem de nucleotídeos ou de resíduos de aminoácido idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtida após o melhor alinhamento (alinhamento ótimo), esta porcentagem sendo puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente em todo o seu comprimento. As comparações de sequência entre duas sequências de ácido nucleico e aminoácido são tradicionalmente realizadas comparando essas sequências após terem sido alinhadas de uma maneira ótima, a dita comparação sendo capaz de ser realizada por segmento ou por "janela de comparação". O alinhamento ótimo das sequências para a comparação pode ser realizado, em adição a manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) [*Ad. App. Math*. 2:482], por meio do algoritmo de homologia local de Neddleman e Wunsch (1970) [*J. Mol. Biol.* 48:443], por meio do método de pesquisa por similaridade de Pearson e Lipman (1988) [*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:2444), por meio de um *software* de computador usando esses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou então com o *software* de comparação BLAST N ou BLAST P).

[0036] A porcentagem de identidade entre duas sequências de ácido nucleico ou aminoácido é determinada através da comparação dessas duas sequências alinhadas de uma maneira ótima e onde a sequência de ácido nucleico ou aminoácido a ser comparada pode compreender adições ou deleções com relação à sequência de referência para um alinhamento ótimo entre estas duas sequências. A porcentagem de identidade é calculada através da determinação do número de posições idênticas para as quais o resíduo de nucleotídeo ou ácido nucleico é idêntico entre as duas sequências, dividindo este número de posições idênticas pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando o resultado obtido por 100 a fim de obter a porcentagem de identidade entre essas duas sequências.

[0037] Por exemplo, é possível usar o programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et.al., "Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol.* Lett. 174:247-250) disponível no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html, os parâmetros usados sendo aqueles dados por *default* (em particular para os parâmetros "penalidade de lacuna aberta": 5 e "penalidade de lacuna de extensão": 2; a matriz escolhida sendo, por exemplo, a matriz "BLOSUM 62" proposta pelo programa), a porcentagem de identidade entre as duas sequências a serem comparadas sendo calculada diretamente pelo programa.

[0038] Para sequência de aminoácido tendo pelo menos 80%, preferivelmente 85%, 90%, 95% e 98%, de identidade com uma sequência de aminoácido de referência, certas modificações, em particular uma deleção, adição ou substituição de pelo menos um aminoácido, um truncamento ou um alongamento são preferidas. No caso de substituição de um ou mais aminoácido(s) consecutivo(s) ou não consecutivo(s), as substituições preferidas são aquelas onde os aminoácidos substituídos são substituídos por aminoácidos "equivalentes". A ex-

pressão "aminoácidos equivalentes" tem como objetivo aqui indicar qualquer aminoácido capaz de substituir um dos aminoácidos da estrutura de base sem, no entanto, essencialmente modificar as atividades biológicas dos anticorpos correspondentes e similar como será definido mais tarde, especialmente nos exemplos. Estes aminoácidos equivalentes podem ser determinados ou se apoiando em sua homologia estrutural com os aminoácidos que eles substituem ou em resultados de testes comparativos de atividade biológica entre os anticorpos diferentes capazes de ser realizados.

[0039] A título de exemplo, é feito menção das possibilidades de substituições que podem ser realizadas sem resultar em uma modificação profunda da atividade biológica do anticorpo modificado correspondente.

[0040] Como exemplo não limitante, a tabela 2 que segue dá possibilidades de substituição concebíveis com uma conservação da atividade biológica do anticorpo modificado. As substituições reversas são também, com certeza, possíveis nas mesmas condições.

Tabela 2

Resíduo original	**Substituição(ões)**
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met

Resíduo original	Substituição(ões)
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
THr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0041] Deve ser compreendido aqui que a invenção não se refere aos anticorpos em forma natural, isto quer dizer que eles não estão em seu ambiente natural, mas que eles são capazes de ser isolados ou obtidos através de purificação de fontes naturais, ou então obtidos através de recombinação genética, ou através de síntese química, e que eles podem então conter aminoácidos naturais como será descrito adicionalmente.

[0042] Deve ser também compreendido, conforme anteriormente mencionado, que a invenção refere-se mais particularmente a um anticorpo divalente quimérico e/ou humanizado, ou qualquer fragmento ou derivado funcional divalente, com uma atividade antagonística. Anticorpos divalentes da técnica anterior são agonistas ou agonistas parciais. O anticorpo monoclonal da invenção, incluindo uma dobra modificada conforme anteriormente descrito, isto é, incluindo uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°: 56, 57 ou 21, é novo e apresenta a particularidade de ter uma atividade antagonística aperfeiçoada comparado com o anticorpo quimérico ou humanizado 224G11 sem tal dobra modificada como será aparente a partir dos exemplos que seguem.

[0043] Contrário à técnica anterior, os inventores obtiveram uma

atividade antagonística aperfeiçoada sem modificação do formato do anticorpo. Na realidade, na técnica anterior mais próxima representada pelo anticorpo 5D5, foi necessário desenvolver um fragmento monovalente do anticorpo para gerar uma atividade antagonística. No presente pedido, através do uso da dobra da invenção, é possível pela primeira vez obter um anticorpo divalente integral com atividade antagonística aumentada, e isto contraria o conhecimento geral.

[0044] Em uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção compreende uma região de dobra compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID N°s: 22 a 28 e 58 a 72 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID N°s: 22 a 28 e 58 a 72.

[0045] Para mais clareza, as tabelas 3 e 4 que seguem reagrupam as sequências de aminoácidos e nucleotídeos das dobras preferidas diferentes da invenção.

Tabela 3

SEQ ID N°.	Aminoácidos	SEQ ID N°.	Nucleotídeos
22	RKCCVECPPCP	29	AGGAAGTGCTGTGTGGAGTGCCCCCCCTGCCCA
23	PRDCGCKPCICT	30	CCCCGGGACTGTGGGTGCAAGCCTTGCATTTGTACC
24	PKSCGCKPCICT	31	CCCAAGAGCTGTGGGTGCAAGCCTTGCATTTGTACC
25	PKSCGCKPCICP	32	CCAAAGAGCTGCGGCTGCAAGCCTTGTATCTGTAAA
26	PRDCGCKPCPPCP	33	CCACGGGACTGTGGCTGCAAGCCCTGCAATCCG-TGTCCA
27	PRDCGCHTCPPCP	34	CCCAGAGACTGTGGGTGTCACACCTGCCCTCCTTG-TCCT
28	PKSCDCHCPPCP	35	CCCAAAAGCTGCGATTGCCACTGTCCTCCATGTCCA
58	CKSCDKTHTCPPCP	73	TGCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT
59	PSCCDKTHTCPPCP	74	CCCTGCAGCTGCGACAAGACCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT
60	PKCCDKTHTCPPCP	75	CCCAAGTGCTGCGACAAGACCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT
61	PKSCCKTHTCPPCP	76	CCTAAGAGCTGTTGCAAGACCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT

SEQ ID N°.	Aminoácidos	SEQ ID N°.	Nucleotídeos
62	PKSCDCTHTCPPCP	77	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT
63	PKSCDKCHTCPPCP	78	CCCAAGAGCTGCGACAAGTGCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT
64	PKSCDKTHCCPPCP	79	CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACTGCTG-TCCCCCCTGCCCT
65	KCDKTHTCPPCP	80	AAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCCCT
66	PKSCDCHTCPPCP	81	CCCAAGAGCTGCGACTGCCACACCTG-TCCCCCCTGCCCT
67	PKSCDCTHCPPCP	82	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACTG-CCCCCCCTGCCCT
68	PSCCKHTCPPCP	83	CCCTGCAGCTGCAAGCACACCTGTCCCCCCTG-CCCT
69	PSCCTHTCPPCP	84	CCTAGCTGCTGCACCCACACCTGTCCCCCCTGCCCT
70	PSCDKHCCPPCP	85	CCCAGCTGCGACAAGCACTGCTGCCCCCCCTG-CCCT
71	PKSCTCPPCP	86	CCCAAGAGCTGCACCTGTCCCCCTTGTCCT
72	PKSCDKCVECPPCP	87	CCCAAGAGCTGCGATAAGTGCGTGGAGTG-CCCCCCTTGTCCT

[0046] De acordo com uma primeira abordagem, o anticorpo será definido por sua sequência de cadeia pesada. Mais particularmente, o anticorpo da invenção, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, é caracterizado pelo fato de compreender uma cadeia pesada compreendendo pelo menos uma CDR escolhida de CDRs compreendendo as sequências de aminoácido SEQ ID Nos: 1 a 3.

[0047] As sequências mencionadas são as que seguem:

SEQ ID N° 1: GYIFTAYT

SEQ ID N° 2: IKPNNGLA

SEQ ID N° 3: ARSEITTEFDY

[0048] De acordo com um aspecto preferido, o anticorpo da invenção, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreende uma cadeia pesada compreendendo pelo menos uma, preferivelmente duas, e mais preferivelmente três, CDR(s) escolhidas de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que

- CDR-H1 compreende a sequência de aminoácido SEQ ID N° 1,

- CDR-H2 compreende a sequência de aminoácido SEQ ID N° 2,

- CDR-H3 compreende a sequência de aminoácido SEQ ID N° 3.

[0049] Em uma segunda abordagem, o anticorpo será agora definido pela sua sequência de cadeia leve. Mais particularmente, de acordo com um segundo aspecto particular da invenção, o anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, é caracterizado pelo fato de que ele compreende uma cadeia leve compreendendo pelo menos uma CDR escolhida de CDRs compreendendo as sequências de aminoácido SEQ ID N°s 5 a 7.

[0050] De acordo com outro aspecto preferido, o anticorpo da invenção, ou um dos seus fragmentos ou derivados funcionais, compreende uma cadeia leve compreendendo pelo menos uma, preferivelmente duas e mais preferivelmente três, CDR(s) escolhidas de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que:

- CDR-L1 compreende a sequência de aminoácido SEQ ID N° 5,

- CDR-L2 compreende a sequência de aminoácido SEQ ID N° 6,

- CDR-L3 compreende a sequência de aminoácido SEQ ID N° 7.

[0051] O hibridoma de murino capaz de secretar anticorpos monoclonais de acordo com a presente invenção, especialmente hibridoma de origem de murino, foi depositado no CNCM (Institut Pasteur, Paris, França) em 14/03/2007 sob o número CNCM I-3731.

[0052] No presente pedido, IgG1 são preferidos para obter funções efetoras, e mais preferivelmente ADCC e CDC.

[0053] O versado na técnica vai reconhecer que funções efetoras incluem, por exemplo, ligação C1q; citotoxidez dependente de complemento (CDC); ligação ao receptor de Fc; citotoxidez mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); fagocitose; e sub-regulagem de receptores de superfície celular (por exemplo, receptor de célula B; BCR).

[0054] Os anticorpos de acordo com a presente invenção são preferivelmente anticorpos monoclonais específicos, especialmente de origem de murino, quimérica ou humanizada, que podem ser obtidos de acordo com os métodos padrão bem conhecidos do versado na técnica.

[0055] Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos ou derivados funcionais, especialmente de origem de murino, é possível se referir a técnicas que são descritas em particular no manual "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbos Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Kohler e Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

[0056] Os anticorpos monoclonais de acordo com a invenção podem ser obtidos, por exemplo, de uma célula animal imunizada contra o c-Met ou um de seus fragmentos contendo o epítopo especificamente reconhecido pelos ditos anticorpos monoclonais de acordo com a invenção. O dito c-Met, ou um de seus ditos fragmentos, pode ser especialmente produzido de acordo com os métodos de trabalho usuais, através de recombinação genética começando a partir de uma sequência de ácido nucleico contida na sequência de cDNA codificando o c-Met ou através de síntese de peptídeo começando a partir de uma sequência de aminoácidos compreendida na sequência de peptídeo do c-Met.

[0057] Os anticorpos monoclonais de acordo com a invenção po-

dem, por exemplo, ser purificados em uma coluna de afinidade onde o c-Met ou um de seus fragmentos contendo o epítopo especificamente reconhecido pelos ditos anticorpos monoclonais de acordo com a invenção foi anteriormente imobilizado. Mais particularmente, os ditos anticorpos monoclonais podem ser purificados através de cromatografia em uma proteína A e/ou G, seguido ou não por cromatografia de troca de íon com objetivo de eliminar os contaminantes de proteína residuais bem como o DNA e o LPS, seguido ou não por cromatografia por exclusão, em gel Sepharose® a fim de eliminar os agregados potenciais devido à presença de dímeros ou outros multímeros. De uma maneira ainda mais preferida, todas essas técnicas podem ser usadas simultaneamente ou sucessivamente.

[0058] O anticorpo da invenção, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, consiste preferivelmente em um anticorpo quimérico.

[0059] Com anticorpo quimérico é pretendido indicar um anticorpo que contém uma região variável natural (cadeia leve e cadeia pesada) derivada de um anticorpo de uma dada espécie em combinação com as regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada de um anticorpo de uma espécie heteróloga para a dita dada espécie (por exemplo, camundongo, cavalo, coelho, cachorro, vaca, galinha, etc).

[0060] Os anticorpos o seus fragmentos de tipo quimérico de acordo com a invenção podem ser preparados usando técnicas de recombinação genética. Por exemplo, o anticorpo quimérico pode ser produzido através de clonagem de um DNA recombinante contendo um promotor e uma sequência codificando a região variável de um anticorpo não humano, especialmente de murino, de acordo com a invenção e uma sequência codificando a região constante de anticorpo humano. Um anticorpo quimérico da invenção codificado por tal gene recombinante será, por exemplo, uma quimera camundongo-homem, a

especificidade deste anticorpo sendo determinada pela região variável derivada do DNA de murino e seu isotipo determinado pela região constante derivada do DNA humano. Quanto aos métodos de preparação de anticorpos quiméricos é possível, por exemplo, se referir aos documentos Verhoeyn *et. al.* (*BioEssays*, 8:74, 1988), Morrison *et. al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6851-6855, 1984) ou US 4.816.567.

[0061] Mais particularmente, o dito anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada quimérico compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 46.

[0062] SEQ ID N° 46: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIF-TAYTMHWVRQSLGE SLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVD-KSSSTAYMDLRS LTSEDSAVYYC ARSEITTEFDYWGQGTALTVSS.

[0063] Mais particularmente, o dito anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia leve quimérico de sequência compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 47.

[0064] SEQ ID NO. 47: ASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFM HWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVE-ADDVATYYCQQSKEDPLTFGSGTKLEMKR

[0065] Mais particularmente, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224G11] [IgG2quim], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 22.

[0066] No presente pedido, o uso de colchetes não é necessário e,

como um exemplo, a referência [224G11] [IgG2quim] deve ser considerada idêntica a 224G11IgG2quim. Da mesma maneira, para indicar que o anticorpo é um de murino, a expressão murino ou a letra m pode ser adicionada; para indicar que o anticorpo é um quimérico, a expressão quim ou a letra c pode ser adicionada e, para indicar que o anticorpo é um humanizado, a expressão hum, hz, Hz ou a letra h pode ser adicionado. Como um exemplo, o anticorpo quimérico 224GIgG2 pode ser referido como c224GHIgG2, c224Gl l [IgG2], c[224Gl l]IgG2, c[224Gl l][IgG2], 224Gl llgG2quim, 224Gl l[IgG2quim], [224Gl l]IgG2quim ou [224Gl l][IgG2quim].

[0067] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224G11] [TH7quim] compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 28.

[0068] No presente pedido, a referência TH7 deve ser considerada idêntica a C7Δ6-9 ou TH7C7Δ6-9. O símbolo Δ significa deleção.

[0069] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [MHquim], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 23.

[0070] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [MUP9Hquim], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID

N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 26.

[0071] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [MMCHquim], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 24.

[0072] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [CI], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequencia de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 58.

[0073] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C2], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID No. 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 59.

[0074] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C3], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a

sequência de aminoácido SEQ ID N° 60.

[0075] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C5], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID No. 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 61.

[0076] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C6], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 62.

[0077] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C7], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID ° 63.

[0078] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C9], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 64.

[0079] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento

ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [ΔI-3], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 65.

[0080] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [C7Δ6], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 66.

[0081] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [C6Δ9], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47, e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 67.

[0082] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [C2Δ5-7], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 68.

[0083] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224Gl 1] [C5Δ2-6], compreende um domínio variável de

cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 69.

[0084] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [C9Δ2-7], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 70.

[0085] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [Δ5-6-7-8], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 71.

[0086] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [IgGI/IgG2], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID. N° 46, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 47 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 72.

[0087] O anticorpo da invenção, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, consiste preferivelmente em um anticorpo humano.

[0088] O termo "anticorpo humano" inclui todos os anticorpos que têm uma ou mais regiões variáveis e constantes derivadas de sequên-

cias de imunoglobulina humana. Em uma modalidade preferida, todos os domínios variáveis e constantes (ou regiões) são derivados de sequência de imunoglobulina humana (anticorpo integralmente humano). Em outras palavras, ele inclui qualquer anticorpo que tenha regiões variáveis e constantes (se presentes) derivadas de sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana, isto é, que possuem uma sequência de aminoácido que corresponde àquela de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi feito usando quaisquer técnicas para fabricação de anticorpos humanos conhecidos do versado na técnica.

[0089] Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada e um transgene de cadeia leve humano fundido a uma célula imortalizada.

[0090] Como exemplo de tal camundongo transgênico pode ser mencionado o XENOMOUSE® que é uma linhagem de camundongo engenheirada que compreende fragmentos dos *loci* de imunoglobulina humana e é deficiente em produção de anticorpo de camundongo (Green *et. al.,* 1994, *Nature Genetics*, 7:13-21). O XENOMOUSE® produz um repertório humano do tipo adulto de anticorpos integralmente humanos e gera anticorpos monoclonais humanos específicos de antígeno. Uma segunda geração de XENOMOUSE® contém aproximadamente 80% do repertório de anticorpo humano (Green & Jakobovits, 1998, *J. Exp. Med.,* 188:483-495).

[0091] Qualquer outra técnica conhecida do versado, tal como técnica de exibição de fago, pode ser também usada para a geração de anticorpo humano de acordo com a invenção.

[0092] O anticorpo da invenção, ou um fragmento ou derivado fun-

cional divalente do mesmo, consiste preferivelmente em um anticorpo humanizado.

[0093] Com a expressão "anticorpo humanizado" é pretendido indicar um anticorpo que contém regiões de CDR derivadas de um anticorpo de origem não humana, as outras partes da molécula de anticorpo sendo derivadas de um (ou vários) anticorpo humano. Além disto, alguns dos resíduos dos segmentos do esqueleto (chamados FR) podem ser modificados a fim de conservar a afinidade da ligação (Jones *et. al., Nature*, 321 :522-525, 1986; Verhoeyen *et. al., Science,* 239:1534-1536, 1988; Riechmann e outros, *Nature,* 332:323-327, 1988).

[0094] Os anticorpos humanizados de acordo com a invenção ou seus fragmentos podem ser preparados através de técnicas conhecidas do versado (tais como, por exemplo, aquelas descritas nos documentos Singer *et. al., J. Immun*. 150:2844-2857, 1992; Mountain e outros., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev*., 10: 1-142, 1992; ou Bebbington e outros, *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992).

[0095] Outros métodos de humanização são conhecidos do versado como, por exemplo, o método "CDR Grafting" descrito pelo Protein Design Lab (PDL) nos pedidos de patente EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 ou US 5.530.101, US 6.180.370, US 5.585.089 e US 5.693.761. Os pedidos de patente que seguem podem ser também mencionados US 5.639.641; US 6.054.297; US 5.886.152 e US 5.877.293.

[0096] Mais particularmente, o dito anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia pesada humanizado de sequência compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 4 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 4.

[0097] SEQ ID N° 4: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIF-TAYTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRDT SISTAYMELSRLRSDDTAVY YCARSEITTEFDYWGQGTLVTVSS

[0098] Mais particularmente, o dito anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, compreende um domínio variável de cadeia leve selecionado do grupo de sequências compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 8, 9 ou 10 ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 8, 9 ou 10.

[0099] SEQ ID N° 8: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSRTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQSKEDP LTFGGGTKVEIKR

[00100] SEQ ID N° 9: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESV-DSYAN SFMHWYQQKP GQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSG-TDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQSKEDP LTFGGGTKVEIKR SEQ ID No. 10: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDSYANS-FLHWYQQKP GQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS-LQAEDVAVYYCQQSKEDP LTFGGGTKVEIKR

[00101] Mais particularmente, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [IgG2Hzl], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 4, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 8 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 22.

[00102] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [IgG2Hz2], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 4, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de

aminoácido SEQ ID N° 9 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 22.

[00103] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [IgG2Hz3], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 4, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 10 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 22.

[00104] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [TH7HzI], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID No° 4, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 8 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 28.

[00105] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [TH7z2], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 4, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 9 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 28.

[00106] Em outro aspecto, um anticorpo preferido, ou um fragmento ou derivado funcional divalente do mesmo, de acordo com a invenção e chamado [224GI 1] [TH7Hz3], compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 4, um domínio variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 10 e uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 28.

[00107] Em outro aspecto, os anticorpos da invenção podem ser descritos pelas suas cadeias pesada e leve totais, respectivamente.

[00108] Como exemplo, o anticorpo [224GI 1] [IgG2quim] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 50, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 50, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID No. 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00109] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [TH7quim] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 51, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 51, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00110] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [CI] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 88, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 88, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00111] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C2] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 89, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 89, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequên-

cia de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00112] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C3] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 90, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 90, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00113] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C5] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 91, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 91, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00114] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C6] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 92, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 92, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00115] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C7] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 93, ou uma sequência tendo pelo

menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 93, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00116] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C9] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 94, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 94, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00117] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [ΔI-3] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 95, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 95, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00118] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C7Δ6] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 96, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 96, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID No. 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00119] Como outro exemplo, o anticorpo [224GI 1] [C6Δ9] da in-

venção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 97, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 97, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00120] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [C2Δ5-7] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 98, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 98, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00121] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [C5Δ2-6] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 99, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 99, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00122] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [C9Δ2-7] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 100, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 100, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a se-

quência SEQ ID N° 52.

[00123] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [Δ5-6-7-8] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 101, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 101, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00124] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [IgGl/IgG2] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 102, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 102, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 52, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 52.

[00125] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [IgG2Hzl] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 36, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 36, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 38, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 38.

[00126] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [IgG2Hz2] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 36, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 36, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequên-

cia de aminoácido SEQ ID N° 39, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 39.

[00127] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [IgG2Hz3] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 36, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 36, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 40, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 40.

[00128] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [TH7Hzl] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 37, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 37, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 38, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 38.

[00129] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [TH7Hz2] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 37, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 37, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 39, ou uma sequência tendo pelo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 39.

[00130] Como outro exemplo, o anticorpo [224Gl 1] [TH7Hz3] da invenção compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 37, ou uma sequência tendo pe-

lo menos 80% de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 37, e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 40, ou uma sequência tendo pelo menos 80 % de identidade após alinhamento ótimo com a sequência SEQ ID N° 40.

[00131] Outros exemplos de anticorpos, ou derivados dos mesmos, de acordo com a invenção compreendem cadeias pesadas completas compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada no grupo consistindo em SEQ ID N°s 88 a 102 (as sequências de nucleotídeo correspondentes são SEQ ID N°s 103 a 117).

[00132] Com "fragmento funcional" de um anticorpo de acordo com a invenção é pretendido indicar em particular um fragmento de anticorpo, tais como fragmentos ou diacorpos Fv, scFv (sc para cadeia simples), Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc, ou qualquer fragmento cujo tempo de meia-vida tivesse sido aumentado através de modificação química, tal como a adição de poli(alquileno)glicol tal como poli(etileno) glicol ("PEGguilação") fragmentos peguilados chamados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')2-PEG ou Fab'-PEG) ("PEG" para Poli(etileno)Glicol) ou através de incorporação em um lipossoma, os ditos fragmentos tendo pelo menos uma das CDRs características de sequências SEQ ID N°s: 1 a 3 e 5 a 7 de acordo com a invenção e, especialmente, pelo fato delas serem capazes de exercer de uma maneira geral uma atividade parcial igual do anticorpo a partir do qual elas são descendentes, tal como em particular a capacidade em reconhecer e se ligar ao c-Met e, se necessário, inibir a atividade do c-Met.

[00133] Preferivelmente, os ditos fragmentos funcionais serão constituídos ou vão compreender uma sequência parcial da cadeia variável pesada ou leve do anticorpo do qual eles são derivados, a dita sequência parcial sendo suficiente para reter a mesma especificidade de ligação que o anticorpo do qual ela é descendente e uma afinidade

suficiente, preferivelmente pelo menos igual a 1/10, de uma maneira mais preferida a pelo menos 1/10, daquela do anticorpo do qual ela é descendente, com relação ao c-Met. Tal fragmento funcional vai conter no mínimo 5 aminoácidos, preferivelmente 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 e 100 aminoácidos, consecutivos da sequência do anticorpo do qual ele é descendente.

[00134] Preferivelmente, estes fragmentos funcionais serão fragmentos do tipo Fv, scFv, Fab, $F(ab')_2$, F(ab'), scFv-Fc ou diacorpos, que geralmente têm a mesma especificidade de ligação que o anticorpo do qual eles são descendentes. Em uma modalidade mais preferida da invenção, estes fragmentos são selecionados dentre fragmentos divalentes tais como fragmentos $F(ab')_2$. De acordo com a presente invenção, os fragmentos de anticorpo da invenção podem ser obtidos partindo de anticorpos tais como descritos acima através de métodos tais como digestão por enzimas, tal como pepsina ou papaína, e/ou através de clivagem das pontes dissulfeto através de redução química. De outra maneira, os fragmentos de anticorpos compreendidos na presente invenção podem ser obtidos através de técnicas de recombinação genética da mesma maneira bem conhecidas do versado na técnica ou então através de síntese de peptídeo por meio de, por exemplo, sintetizadores de peptídeo automáticos tais como aqueles fornecidos pela companhia Applied Biosystems, etc.

[00135] Por "fragmento divalente" deve ser compreendido quaisquer fragmentos de anticorpo compreendendo dois braços, mais particularmente, fragmentos $F(ab')_2$.

[00136] Por "derivados" de um anticorpo de acordo com a invenção quer dizer uma proteína de ligação compreendendo uma base de proteína e pelo menos uma das CDRs selecionadas do anticorpo original a fim de manter a capacidade de ligação. Tais compostos são bem conhecidos pelo versado na técnica e serão descritos em mais detalhes

no relatório que segue.

[00137] Mais particularmente, o anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, de acordo com a invenção é caracterizado pelo fato de que o dito derivado consiste em uma proteína de ligação compreendendo uma base na qual pelo menos uma CDR foi enxertada para a conservação das propriedades de reconhecimento paratópicas do anticorpo original.

[00138] Uma ou várias sequências nas 6 sequências de CDR descritas na invenção podem ser apresentadas em uma base de proteína. Neste caso, a base da proteína reproduz a estrutura principal da proteína com dobra apropriada das CDRs(s) enxertadas, desta maneira permitindo que ela (ou elas) mantenha(m) suas propriedades de reconhecimento paratópico do antígeno.

[00139] O versado na técnica também sabe como selecionar a base da proteína na qual pelo menos uma CDR selecionada do anticorpo original poderia ser enxertada. Mais particularmente, é conhecido que, para ser selecionada, tal base deve mostrar várias características que seguem (Skerra, A., *J. Mol. Recogn.*, 13, 2000, 167-187).

- conservação filogeneticamente boa,
- arquitetura robusta com uma organização molecular tridimensional bem conhecida (tal como, por exemplo, cristalografia ou NMR),
- tamanho pequeno,
- nenhum ou um grau muito baixo de modificações pós-traducionais,
- facilidade de produzir, expressar e purificar.

[00140] Tal base de proteína pode ser, mas sem limitação, estrutura selecionada do grupo consistindo em fibronectina e preferivelmente o décimo domínio tipo III da fibronectina (FNfn10), lopocalina, anticalina (Skerra, A., *J. Biotechnol.*, 2001, 74(4):257-75), o derivado da proteína

Z do domínio B da proteína A *staphylococcal,* tiorredoxina A ou qualquer proteína com domínio repetido tal como "repetição de anquirina" (Kohl *et. al.,* PNAS, 2003, vol. 100, N° 4, 1700-1705), "repetição de armadillo", "repetição rica em leucina" ou "repetição de tetratricopeptídeo".

[00141] Poderia ser também mencionado derivado de base de toxinas (tais como, por exemplo, toxinas do escorpião, inseto, planta ou molusco) ou inibidores de proteína da óxido nítrico sintase neuronal (PIN).

[00142] Como exemplo não limitante de tais construções híbridas pode ser mencionada a inserção da CDR-H1 (cadeia pesada) de um anticorpo anti-CD4, isto é, o anticorpo 13B8.2, em uma da alça exposta da PIN. As propriedades de ligação da proteína de ligação obtida permanecem similares ao anticorpo original (Bes *et. al., BBRC* 343, 2006, 334-344). Pode ser também mencionado o enxerto da CDR-H3 (cadeia pesada) de anticorpo VHH antilizozima em uma alça de neocarzinostatina (Nicaise *et. al.,* 2004).

[00143] Conforme acima mencionado, tal base de proteína pode compreender a partir de 1 a 6 CDR(s) do anticorpo original. Em uma modalidade preferida, mas sem qualquer limitação, o versado na técnica selecionaria pelo menos uma CDR da cadeia pesada, a dita cadeia pesada sendo conhecida estar particularmente implicada na especificidade de anticorpo. A seleção das CDR(s) de interesse será evidente para o versado na técnica com método conhecido (BES *et. al., FEBS Letters*, 508, 2001, 67-74).

[00144] Como uma evidência, esses exemplos não são limitantes e qualquer outra base conhecida ou descrita deve ser incluída no presente pedido.

[00145] De acordo com um novo aspecto, a presente invenção refere-se a um ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que ele é

escolhido dos ácidos nucleicos que seguem:

um ácido nucleico, DNA ou RNA, codificando um anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, de acordo com a invenção;

uma sequência de ácido nucleico compreendendo as sequências SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 e as sequências SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16 e SEQ ID N° 17.

uma sequência de ácido nucleico compreendendo as sequências SEQ ID N° 14 e SEQ ID N° 18, 19 ou 20;

os ácidos nucleicos de RNA correspondentes dos ácidos nucleicos conforme definido em b) ou c);

os ácidos nucleicos complementares dos ácidos nucleicos conforme definido em a), b) e c); e

um ácido nucleico de pelo menos 18 nucleotídeos capaz de hibridizar sob condições de alta adstringência com pelo menos uma das CDRs das sequências SEQ ID N°s. 11 a 13 e 15 a 17.

[00146] De acordo com ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um ácido nucleico isolado caracterizado pelo fato de que ele é escolhido dos ácidos nucleicos que seguem:

- um ácido nucleico, DNA ou RNA, codificando um anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, de acordo com a presente invenção e onde a sequência de ácido nucleico codificando a região de dobra do dito anticorpo compreende ou tem uma sequência selecionada do grupo consistindo nas sequências SEQ ID N°s. 29 a 35 e SEQ ID N°s. 73 a 87.

[00147] Com ácido nucleico, sequência nucleica ou de ácido nucleico, polinucleotídeo, nucleotídeo, sequência de polinucleotídeo, sequência de nucleotídeo, termos que serão empregados indiferentemente na presente invenção, é pretendido indicar uma ligação precisa de nucleotídeos, que são modificados ou não modificados, permitindo

que um fragmento ou uma região de um ácido nucleico seja definido, contendo ou não contendo nucleotídeos naturais, e sendo capaz de corresponder muito bem a um DNA de filamento duplo, um DNA de filamento simples como os produtos de transcrição dos ditos DNAs.

[00148] Deve ser também compreendido aqui que a presente invenção não se refere a sequências de nucleotídeo em seu ambiente cromossomal natural, isto que dizer, no estado natural. Ela refere-se a sequências que foram isoladas e/ou purificadas, isto quer dizer que elas foram selecionadas diretamente ou indiretamente, por exemplo, através de cópia, seu ambiente sendo pelo menos parcialmente modificado. É então da mesma maneira pretendido indicar aqui os ácidos nucleicos isolados obtidos através de recombinação genética através de, por exemplo, células hospedeiras ou obtidos através de síntese química.

[00149] Uma hibridização sob condições de alta adstringência significa que as condições de temperatura e condições de resistência iônica são escolhidas de tal maneira que elas permitem a manutenção da hibridização entre dois fragmentos de DNA complementares. A título de ilustração, condições de alta adstringência da etapa de hibridização para os propósitos de definição dos fragmentos de polinucleotídeos descritos acima são vantajosamente as que seguem.

[00150] A hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA é realizada em duas etapas: (1) pré-hibridização a 42º C por 3 horas em tampão de fosfato (20 mM, H 7,5) contendo 5 x SSC (1 x SSC corresponde à solução de NaCl 0,15 M + citrato de sódio 0,015M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10 x Denhardt's, 5% de dextrano sulfato e 1% de DNA de esperma de salmão; (2) hibridização real por 20 horas em uma temperatura dependente do tamanho da sonda (isto é, 42º C para um tamanho de sonda >100 nucleotídeos) seguido por 2 lavagens de 20 minutos a 10º C em 2 x SSC + 2% de SDS, 1

lavagem de 20 minutos a 20º C em 0,1% x SSC + 0,1% de SDS. A última lavagem é realizada em 0,1 x SSC + 0,1% de SDS por 30 minutos a 60º C para um tamanho de sonda > 100 nucleotídeos. As condições de hibridização de alta adstringência descritas acima para um polinucleotídeo de tamanho definido podem ser adaptadas pelo versado na técnica para oligonucleotídeos de tamanho maior ou menor, de acordo com o ensinamento de Sambrook et. al. (1989, *Molecular Cloning: a laboratory manual,* 2ª Ed., Cold Spring Harbor).

[00151] A invenção refere-se da mesma maneira a um vetor compreendendo um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[00152] A invenção tem como objetivo especialmente vetores de clonagem e/ou expressão que contêm uma sequência de nucleotídeo de acordo com a invenção.

[00153] Os vetores de acordo com a invenção contêm preferivelmente elementos que permitem a expressão e/ou a secreção das sequências de nucleotídeo traduzidas em uma determinada célula hospedeira. O vetor deve então conter um promotor, sinais de início e término de tradução, bem como regiões apropriadas de regulagem de transcrição. Ele deve ser capaz de ser mantido de uma maneira estável na célula hospedeiro e pode particularmente ter sinais particulares que especificam a secreção da proteína traduzida. Estes elementos diferentes são escolhidos e otimizados por um versado na técnica como uma função da célula hospedeiro usada. Para este efeito, as sequências de nucleotídeo de acordo com a invenção podem ser inseridas em vetores de replicação autônomos no hospedeiro escolhido ou ser vetores integrantes do hospedeiro escolhido.

[00154] Tais vetores são preparados através de métodos atualmente usados pelo versado na técnica, e os clones resultantes podem ser introduzidos em um hospedeiro apropriado através de métodos padrão tais como lipofecção, eletroporação, choque térmico ou métodos quí-

micos.

[00155] Os vetores de acordo com a invenção são, por exemplo, vetores de origem plasmídica ou viral. Eles são úteis para transformação de células hospedeiras a fim de clonar ou expressar as sequências de nucleotídeo de acordo com a invenção.

[00156] A invenção compreende da mesma maneira as células hospedeiras transformadas ou compreendendo um vetor de acordo com a invenção.

[00157] A célula hospedeira pode ser escolhida de sistemas procarióticos ou eucarióticos, por exemplo, células bacterianas, mas da mesma maneira células de levedura ou células animais, em particular células de mamífero. É da mesma maneira possível usar células de inseto ou células de planta.

[00158] A invenção refere-se da mesma maneira a animais, exceto o homem, que compreendem pelo menos uma célula transformada de acordo com a invenção.

[00159] De acordo com outro aspecto, um objetivo da invenção é um processo para produção de um anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção, caracterizado pelo fato de que ele compreende os estágios que seguem:

cultura em um meio e condições de cultura apropriadas de uma célula hospedeiro de acordo com a invenção; e

a recuperação dos ditos anticorpos, ou um dos seus fragmentos funcionais, desta maneira produzidos partindo do meio de cultura ou das ditas células culturadas.

[00160] As células transformadas de acordo com a invenção podem ser usadas em processos para preparação de polipeptídeos recombinantes de acordo com a invenção. Os processos para preparação de um polipeptídeo de acordo com a invenção em forma recombinante, caracterizados pelo fato de que eles empregam um vetor e/ou uma

célula transformada por um vetor de acordo com a invenção, estão compreendidos na presente invenção. Preferivelmente, uma célula transformada por um vetor de acordo com a invenção é culturada sob condições que permitem a expressão do dito polipeptídeo e dito polipeptídeo recombinante é recuperado.

[00161] Como foi dito, a célula hospedeira pode ser escolhida de sistemas procarióticos ou eucarióticos. Em particular, é possível identificar sequências de nucleotídeo de acordo com a invenção, facilitando a secreção em tal sistema procariótico ou eucariótico. Um vetor de acordo com a invenção carregando tal sequência pode então ser vantajosamente usado para a produção de proteínas recombinantes, que pretendem ser secretadas. Na realidade, a purificação dessas proteínas recombinantes de interesse será facilitada pelo fato de que elas estão presentes no sobrenadante da cultura celular ao invés do interior das células hospedeiro.

[00162] É da mesma maneira possível preparar os polipeptídeos de acordo com a invenção através de síntese química. Tal processo de preparação é da mesma maneira um objeto da invenção. O versado na técnica conhece os processos de síntese química, por exemplo, as técnicas empregando fases sólidas [Stewart *et. al.,* 1984, *Solid phase peptide synthesis,* Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ª ed. (1984)] ou técnicas usando fases sólidas parciais, através de condensação de fragmentos ou através de síntese clássica em solução. Os peptídeos obtidos através de síntese química e sendo capazes de contar aminoácidos não naturais correspondentes são da mesma maneira compreendidos na invenção.

[00163] Os anticorpos, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, capazes de ser obtidos através de um processo de acordo com a invenção são da mesma maneira compreendidos na presente invenção.

[00164] A invenção refere-se também ao anticorpo da invenção como um medicamento.

[00165] A invenção refere-se da mesma maneira a uma composição farmacêutica compreendendo a título de princípio ativo um composto consistindo em um anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção, preferivelmente misturados com um excipiente e/ou um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00166] Outra modalidade complementar da invenção consiste em uma composição tal como acima descrito que compreende, além disso, como um produto de combinação para uso simultâneo, separado ou sequencial, um anticorpo antitumoral.

[00167] Mais preferivelmente, o dito segundo anticorpo antitumoral poderia ser escolhido de anti-IGF-IR, anti-EGFR, anti-HER2/neu, anti-VEGFR, anti-VEGF, etc, anticorpos ou quaisquer outros anticorpos antitumorais pelo versado na técnica. É evidente que o uso, como segundo anticorpo, de fragmentos ou derivados funcionais de anticorpos mencionados acima é parte da invenção.

[00168] Como um anticorpo mais preferido, anticorpos anti-EGFR são selecionados tal como, por exemplo, o anticorpo C225 (Erbitux).

[00169] "Uso simultâneo" é compreendido como significando a administração dos dois compostos da composição de acordo com a invenção em uma forma farmacêutica única e idêntica.

[00170] "Uso separado" é compreendido como significando a administração, ao mesmo tempo, dos dois compostos da composição de acordo com a invenção em formas farmacêuticas distintas.

[00171] "Uso sequencial" é compreendido como significando a administração sucessiva dos dois compostos da composição de acordo com a invenção, cada um em uma forma farmacêutica distinta.

[00172] De uma maneira geral, a composição de acordo com a invenção aumenta consideravelmente a eficácia do tratamento de cân-

cer. Em outras palavras, o efeito terapêutico dos anticorpos anti-c-Met de acordo com a invenção é potencializado de uma maneira inesperada através da administração de um agente citotóxico. Outra vantagem subsequente grande produzida por uma composição de acordo com a invenção refere-se à possibilidade de uso de doses eficazes mais baixas de princípio ativo, o que permite que os riscos de aparecimento de efeitos secundários seja evitado ou seja reduzido, em particular os efeitos do agente citotóxico.

[00173] Ainda, a composição de acordo com a invenção permitiria que o efeito terapêutico fosse atingido mais rapidamente.

[00174] A composição da invenção pode ser também caracterizada pelo fato de compreender, além disso, como um produto de combinação para uso simultâneo, separado ou sequencial, um agente citotóxico/citostático.

[00175] Por "agentes terapêuticos anticâncer" ou "agentes citotóxicos/citostáticos" entende-se uma substância que, quando administrada a um indivíduo, trata ou previne o desenvolvimento de câncer no corpo do indivíduo. Como exemplo não-limitante de tais agentes podem ser mencionados agentes de alquilação, antimetabolitos, antibióticos antitumor, inibidores mitóticos, inibidores da função cromática, agentes antiangiogênese, antiestrogênios, antiandrogênios ou imunomoduladores.

[00176] Tais agentes são, por exemplo, mencionados na edição 2001 de VIDAL, na página dedicada aos compostos anexos à coluna "Citotóxicos" de cancerologia e hematologia, esses compostos citotóxicos mencionados com referência a este documento são mencionados aqui como agentes citotóxicos preferidos.

[00177] Mais particularmente, os agentes que seguem são preferidos de acordo com a invenção.

[00178] "Agente de alquilação" refere-se a qualquer substância que

pode reticular ou alquilar qualquer molécula, preferivelmente ácido nucleico (por exemplo, DNA), dentro de uma célula. Exemplos de agentes de alquilação incluem nitrogênio mostarda tal como mecloretamina, clorambutol, melfaleno, cloridrato, pipobromeno, prednimustina, fosfato dissódico ou estramustina; oxazoforinas tal como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida ou ifosfamida; aziridinas ou iminoetilenos tal com tiotepa, trietilenamina ou altetramina; nitrosoureia tal como carmustina, estreptozocina, fotemustina ou lomustina; alquilsulfonatos tal como bussulfano, treossulfano ou improssulfano; triazenos tal como decarbazina; ou complexos de platina tais como cis-platina, oxaliplatina e carboplatina.

[00179] "Anti-metabolitos" refere-se a substâncias que bloqueiam o crescimento e/ou metabolismo celular através de interferência com certas atividades, geralmente síntese de DNA. Exemplos de anti-metabolitos incluem metotrexato, 5-fluoruracila, floxuridina, 5-fluordesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinosídeo, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, desoxicoformicina e pentostatina.

[00180] "Antibióticos antitumor" refere-se a compostos que podem prevenir ou inibir síntese de DNA, RNA e/ou proteína. Exemplos de antibióticos antitumor incluem doxorrubicina, daunorrubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina e procarbazina.

[00181] "Inibidores mitóticos" previnem a progressão normal do ciclo celular e mitose. Em geral, inibidores de microtúbulo ou taxoides tais como paclitaxel e docetaxel são capazes de inibir mitose. Vinca alcaloide tais como vimblastina, vincristina, vindesina e vinorrelbina são também capazes de inibição de mitose.

[00182] "Inibidores da função de cromatina" ou "inibidores da topoisomerase" referem-se a substâncias que inibem a função normal de

proteínas de modelagem de cromatina tal como topoisomerase I ou topoisomerase II. Exemplos de inibidores da função de cromatina incluem, para topoisomerase I, camptotecina e seus derivados tal como topotecano e irinotecano, e para topoisomerase II, etoposídeo, etoposídeo fosfato e teniposídeo.

[00183] "Agente antiangiogênese" refere-se a qualquer fármaco, composto, substância ou agente que inibe crescimento de vasos sanguíneos. Agentes antiangiogênese exemplares incluem, mas não estão de maneira alguma limitados a, razoxina, marimastate, batimastate, prinomastate, tanomastate, ilomastate, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastate, BMS-275291, talidomida, CD501, DMXAA, L-651582, esqualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferon-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862 e angiostatina e vitaxina.

[00184] "Antiestrogênio" ou "agente antiestrogênico" refere-se a qualquer substância que reduz, antagoniza ou inibe a ação de estrogênio. Exemplos de agentes antiestrogênio são tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozol, letrozol e exemestano.

[00185] "Antiandrogênios" ou "agente antiandrogênio" refere-se a qualquer substância que reduz, antagoniza ou inibe a ação de um androgênio. Exemplos de antiandrogênio são flutamida, nilutamida, bicalutamida, espironolactona, ciproterona acetato, finasterida e cimitidina.

[00186] "Imunomoduladores" são substâncias que estimulam o sistema imune.

[00187] Exemplos de ofimmoduladores incluem interferon, interleucina tal como aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox e interleucina-2-, fator de necrose tumoral tal como tasonermina *et. al.* imunomoduladores tais como lentinano, sizofirano, roquinimex, pidotimode, pegademase, timopentina, poli I:C ou levamisol em conjunto com 5-fluoruracila.

[00188] Para mais detalhes, o versado na técnica poderia fazer referência ao manual editado pela "Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique" e intitulado "Ttaité de chimie thérapeutique", vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edição TEC & DOC, 2003.

[00189] Podem ser também mencionados como agentes químicos ou agentes citotóxicos todos os inibidores de cinase tal como, por exemplo, gefitinite ou erlotinibe.

[00190] Em uma modalidade particularmente preferida, a dita composição como um produto de combinação de acordo com a invenção é caracterizada pelo fato do dito agente citotóxico ser acoplado quimicamente ao dito anticorpo para uso simultâneo.

[00191] A fim de facilitar o acoplamento entre o dito agente citotóxico e o dito anticorpo de acordo com a invenção, é especialmente possível introduzir moléculas espaçadoras entre os dois compostos a serem acoplados, tais como poli(alquileno)glicóis tal como polietileno glicol, ou então aminoácidos, ou, em outra modalidade, usar derivados ativos dos ditos agentes citotóxicos onde teriam sido introduzidas funções capazes de reagir com o dito anticorpo de acordo com a invenção. Estas técnicas de acoplamento são bem conhecidas do versado na técnica e não serão prolongadas no presente relatório.

[00192] A invenção refere-se, em outro aspecto, a uma composição caracterizada pelo fato de que um, pelo menos, dos ditos anticorpos, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, é conjugado com uma toxina celular e/ou um radioelemento.

[00193] Preferivelmente, a dita toxina ou o dito radioelemento é capaz de inibição de pelo menos uma atividade celular de células expressando o c-Met, em de uma maneira mais preferida capaz de prevenção do crescimento ou da proliferação da dita célula, especialmente de inativação total da dita célula.

[00194] Preferivelmente também, a dita toxina é uma toxina enterobacteriana, especialmente exotoxina A de *Pseudomonas.*

[00195] Os radioelementos (ou radioisótopos) preferivelmente conjugados aos anticorpos empregados para a terapia são radioisótopos que emitem raios gama e preferivelmente iodo^{131}, ítrio^{90}, gold^{199}, paládio^{100}, cobre^{67}, bismuto^{217} e antimônio^{211}. Os radioisótopos que emitem raios beta e alfa podem da mesma maneira ser usados para a terapia.

[00196] Com toxina ou radioelemento conjugado apelo menos um anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais, de acordo com a invenção, é pretendido indicar qualquer meio que permita que a dita toxina ou dito radioelemento se ligue ao dito pelo menos um anticorpo, especialmente através de acoplamento covalente entre os dois compostos, com ou sem introdução de uma molécula de ligação.

[00197] Dentre os agentes que permitem ligação de uma maneira química (covalente), eletrostática ou não covalente de todos ou parte dos compostos do conjugado, menção pode ser particularmente feita à benzoquinona, carbodi-imida e, mais particularmente, EDC cloridrato de (1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodi-imida), dimaleimida, ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tio-acetato (SATA), os agentes de formação de ponte tendo um ou mais grupos fenilazida reagindo com os ultravioletas (U.V.) e preferivelmente N-[4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimidil 3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

[00198] Outra forma de acoplamento, especialmente para os radioelementos, pode consistir no uso de um quelante de íon bifuncional.

[00199] Dentre esses quelatos, é possível mencionar os quelatos derivados de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) ou de DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético) que foram desenvolvidos para ligação de metais, especialmente metais radioativos, e imunoglobulinas. Desta maneira, DTPA e seus derivados podem ser substituídos

por grupos diferentes na cadeia carbono a fim de aumentar a estabilidade e a rigidez do complexo ligante-metal (Krejcarek e outros (1977); Brechbiel *et. al.* (1991); Gansow (1991); patente U.S. 4.831.175).

[00200] Por exemplo, ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e seus derivados, que têm sido amplamente usados na medicina e na biologia por um longo tempo ou em sua forma livre ou na forma de um complexo com um íon metálico, têm uma característica notável de formação de quelatos estáveis com íons metálicos e de ser acoplados com proteínas de interesse terapêutico ou de diagnóstico tais como anticorpos para o desenvolvimento de radioimunoconjugados em terapia de câncer (Meases *et. al.,* 1984; Gansow *et. al.,* 1990).

[00201] Da mesma maneira preferivelmente, o dito pelo menos um anticorpo formando o dito conjugado de acordo com a invenção é escolhido de seus fragmentos funcionais, especialmente os fragmentos amputados de seu componente Fc tais como os fragmentos scFv.

[00202] Como já mencionado, em uma modalidade preferida da invenção, o dito agente citotóxico/citostático ou dita toxina e/ou um radioelemento é acoplado quimicamente a pelo menos um dos elementos da dita composição para uso simultâneo.

[00203] A presente invenção compreende a composição descrita como um medicamento.

[00204] A presente invenção compreende ainda o uso da composição de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento.

[00205] Em outro aspecto, a invenção refere-se ao uso de um anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, e/ou de uma composição conforme acima descrito para a preparação de um medicamento pretendido inibir o crescimento e/ou a proliferação de células de tumor.

[00206] Outro aspecto da invenção consiste no uso de um anticor-

po, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais e/ou de uma composição, conforme descrito acima ou no uso acima mencionado, para a preparação de um medicamento pretendido para a prevenção ou para o tratamento de câncer.

[00207] É também compreendido na presente invenção um método que pretende inibir o crescimento e/ou a proliferação de células de tumor em um paciente compreendendo a administração ao paciente com necessidade do mesmo de um anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais de acordo com a invenção, um anticorpo produzido através de um hibridoma de acordo com a invenção ou uma composição de acordo com a invenção.

[00208] A presente invenção compreende ainda um método para a prevenção ou o tratamento de câncer em um paciente com necessidade do mesmo compreendendo a administração ao paciente de um anticorpo, ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais de acordo com a invenção, um anticorpo produzido por um hibridoma de acordo com a invenção ou uma composição de acordo com a invenção.

[00209] Em um aspecto preferido particular, o dito câncer é um câncer escolhido de câncer de próstata, osteossarcoma, câncer pulmonar, câncer de mama, câncer endometrial, glioblastoma ou câncer de colo.

[00210] Conforme explicado antes, uma vantagem da invenção é permitir o tratamento de cânceres relacionados com ativação de Met dependentes e independentes de HGF.

[00211] A invenção, em ainda outro aspecto, compreende um método de diagnóstico *in vitro* de doenças induzidas por uma superexpressão ou uma subexpressão do receptor c-Met partindo de uma amostra biológica onde a presença anormal do receptor c-Met é suspeita, o dito método sendo caracterizado pelo fato de compreender uma etapa onde a dita amostra biológica é contatada com um anticor-

po da invenção, sendo possível que o dito anticorpo seja, se necessário, marcado.

[00212] Preferivelmente, as ditas doenças ligadas à presença anormal de receptor c-Met no dito método de diagnóstico serão cânceres.

[00213] O dito anticorpo, ou um de seus fragmentos funcionais, pode estar presente na forma de um imunoconjugado ou de um anticorpo marcado de maneira a obter um sinal detectável e/ou quantificável.

[00214] Os anticorpos marcados de acordo com a invenção ou seus fragmentos funcionais incluem, por exemplo, anticorpos chamados imunoconjugados que podem ser conjugados, por exemplo, com enzimas tais como peroxidase, fosfatase alcalina, beta-D-galactosidase, glicose oxidase, glicose amilase, anidrase carbônica, acetilcolinesterase, lisozima, malato desidrogenase ou glicose 6-fosfato desidrogenase ou por uma molécula tal como biotina, digoxigenina ou 5-bromodesoxiuridina. Marcadores fluorescentes podem da mesma maneira serem conjugados aos anticorpos ou aos seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção e especialmente incluem fluoresceína e seus derivados, fluorcromo, rodamina e seus derivados, GFP (GFP para "Proteiína Verde Fluorescente" – "Green Fluorescent Protein", dansila, umbeliferone, etc. Em tais conjugados, os anticorpos da invenção ou seus fragmentos funcionais podem ser preparados através de métodos conhecidos do versado. Eles podem ser acoplados às enzimas ou aos marcadores fluorescentes diretamente ou por intermédio de um grupo espaçador ou de um grupo de ligação tal como um polialdeído, tal como glutaraldeído, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentaacético (DPTA) ou na presença de agentes de acoplamento tais como aqueles mencionados acima para os conjugados terapêuticos. Os conjugados contendo marcadores do tipo fluoresceína podem ser preparados através de reação com um isotiocianato.

[00215] Outros conjugados podem da mesma maneira incluir marcadores quimioluminescentes tais como luminol e os dioxetanos, marcadores bioluminescentes tais como luciferase e luciferina, ou então marcadores radioativos tais como iodo^{123}, iodo^{125}, iodo^{126}, iodo^{133}, bromo^{77}, tecnécio"^{111}, índio^{111}, índio^{113}"^{1}, gálio^{67}, gálio^{68}, rutênio^{95}, rutênio^{97}, rutênio^{103}, rutênio^{105}, mercúrio^{107}, mercúrio^{203}, rênio^{99}"^{1}, rhenio^{101}, rênio^{105}, escândio^{47}, telúrio^{121}"^{1}, telúrio^{122m}, telúrio^{125m}, túlio^{165}, túlio^{167}, túlio^{168}, fluor^{18}, ítrio^{199}, iodo^{131}. Os métodos conhecidos do versado na técnica existentes para acoplamento dos radioisótopos terapêuticos aos anticorpos ou diretamente ou através de um agente de quelação tais como EDTA, DTPA mencionados acima podem ser usados para os radioelementos que podem ser usados em diagnóstico. É da mesma maneira possível mencionar marcação com Na$^{[I125]}$ pelo método cloramina T [Hunter, W.M. e Greenwood, F.C. (1962) *Nature* 194:495] ou então com tecnécio^{99m} através da técnica de Crockford e outros (patente U.S. 4.424.200) ou ligação através de DTPA conforme descrito por Hnatowich (patente U.S. 4.479.930).

[00216] Desta maneira, o anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, de acordo com a invenção pode ser empregado em um processo para a detecção e/ou a quantificação de uma superexpressão ou de uma subexpressão, preferivelmente uma superexpressão, do receptor c-Met em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que ele compreende as etapas que seguem:

o contato da amostra biológica com um anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, de acordo com a invenção; e

a demonstração do complexo c-Met/anticorpo possivelmente formado.

[00217] Em uma modalidade particular, o anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, de acordo com a invenção, pode

ser empregado em um processo para a detecção e/ou a quantificação do receptor c-Met em uma amostra biológica, para o monitoramento da eficácia de um tratamento profilático e/ou terapêutico de câncer dependente de c-Met.

[00218] Com mais frequência, o anticorpo ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, de acordo com a invenção pode ser vantajosamente empregado em qualquer situação onde a expressão do receptor c-Met deve ser observada de uma maneira qualitativa e/ou quantitativa.

[00219] Preferivelmente, a amostra biológica é formada por um fluido biológico, tal como soro, sangue integral, células, uma amostra de tecido ou biópsias de origem humana.

[00220] Qualquer procedimento ou teste convencional pode ser empregado a fim de realizar tal detecção e/ou dosagem. O dito teste pode ser um teste de competição ou sanduíche ou qualquer teste conhecido do versado na técnica dependente da formação de um complexo imune do tipo anticorpo-antígeno. Seguindo a aplicação de acordo com a invenção, o anticorpo ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo pode ser imobilizado ou marcado. Esta imobilização pode ser realizada em vários apoios conhecidos do versado na técnica. Esses apoios podem incluir especialmente vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, náilon ou células naturais ou modificadas. Esses apoios podem ser ou solúveis ou insolúveis.

[00221] A título de exemplo, um método preferido traz à cena processos imunoenzimáticos de acordo com a técnica ELISA, através de imunofluorescência ou técnica de radioimunoensaio (RIA) ou equivalente.

[00222] Desta maneira, a presente invenção compreende da mesma maneira os estojos ou conjuntos necessários para realizar um método de diagnóstico de doença induzida por uma superexpressão ou

uma subexpressão do receptor c-Met ou para realizar um processo para a detecção e/ou a quantificação de uma superexpressão ou de uma subexpressão do receptor c-Met em uma amostra biológica, preferivelmente uma superexpressão do dito receptor, caracterizado pelo fato do dito estojo ou conjunto compreender os elementos que seguem:

um anticorpo, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, de acordo com a invenção;

opcionalmente, os reagentes para a formação do meio favorável para a reação imunológica;

opcionalmente, os reagentes que permitem a demonstração de complexos c-Met/anticorpo produzidos através da reação imunológica.

[00223] Um objetivo da presente invenção é da mesma maneira o uso de um anticorpo ou uma composição de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento pretendido para o direcionamento específico de um composto biologicamente ativo a células expressando ou superexpressando o receptor c-Met.

[00224] É pretendido aqui por composto biologicamente ativo indicar qualquer composto capaz de modular, especialmente de inibir, atividade celular, em particular seu crescimento, sua proliferação, transcrição ou tradução de gene.

[00225] Um objetivo da invenção é também um reagente de diagnóstico *in vivo* compreendendo um anticorpo de acordo com a invenção, ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo, preferivelmente marcado, especialmente radiomarcado, e seu uso em imagem médica, em particular para a detecção de câncer ligado com a expressão ou superexpressão por uma célula do receptor c-Met.

[00226] A invenção refere-se da mesma maneira a uma composição como um produto de combinação ou a um conjugado anti-c-

Mettoxina ou radioelemento, de acordo com a invenção, como um medicamento.

[00227] Preferivelmente, a dita composição como um produto de combinação ou dito conjugado de acordo com a invenção será misturado com um excipiente /ou um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00228] No presente relatório, veículo farmaceuticamente aceitável pretende indicar um composto ou uma combinação de compostos que entra em uma composição farmacêutica sem provocar reações secundárias e que permite, por exemplo, facilitação da administração do(s) composto(s) ativo(s), um aumento em seu tempo de vida e/ou em sua eficácia no corpo, um aumento em sua solubilidade em solução ou então uma melhora em sua conservação. Esses veículos farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos e serão adaptados pelo versado na técnica como uma função da natureza e do modo de administração do(s) composto(s) ativo escolhido(s).

[00229] Preferivelmente, esses compostos serão administrados através de via sistêmica, em particular através de via intravenosa, através de via intramuscular, intradermal, intraperitoneal ou subcutânea ou através da via oral. Em uma maneira mais preferida, a composição compreendendo os anticorpos de acordo com a invenção será administrada várias vezes, de uma maneira sequencial.

[00230] Seus modos de administração, dosagens e formas farmacêuticas ótimas podem ser determinados de acordo com os critérios geralmente levados em consideração no estabelecimento de um tratamento adaptado para um paciente tal como, por exemplo, a idade ou o peso do corpo do paciente, a seriedade de sua condição geral, a tolerância ao tratamento e os efeitos secundários notados.

[00231] Outras características e vantagens da invenção aparecem na continuação do relatório com os exemplos e figuras onde:

figura 1: Efeito de Mabs IgG1 irrelevantes de origem de

camundongo e humana e PBS em fosforilação do receptor c-Met em células A549.

[00232] Figuras 2A e 2B: Efeito de Mabs 224G11 de murino e humanizados produzidos como um isotipo IgG1/kappa humano sobre fosforilação do receptor c-Met em células A549.

[00233] Figura 2A: Efeito agonista calculado como porcentagem versus estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00234] Figura 2B: efeito antagonista calculado como porcentagem de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00235] Figuras 3A e 3B: Comparação entre Mab 224G11 de murino e 224G11 quimérico contendo várias regiões de dobra engenheiradas em fosforilação de c-Met em células A549.

[00236] Figura 3A: efeito agonista calculado como porcentagem versus estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml];

[00237] Figura 3B: efeito antagonista calculado como porcentagem de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00238] Figuras 4A e 4B: Comparação entre Mab 224G11 de murino e Mabs 224G11 quiméricos e humanizados produzidos como um isotipo IgG2/kappa humano em fosforilação do receptor c-Met em células A549.

[00239] Figura 4A: efeito agonista calculado como porcentagem versus estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00240] Figura 4B: efeito antagonista calculado como porcentagem de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00241] Figuras 5A e 5B: Comparação entre Mab 224G11 de murino e Mabs 224G11 quiméricos e humanizados produzidos como um mutante de dobra engenheirada TH7IgG1/kappa em fosforilação do receptor c-Met em células A549.

[00242] Figura 5A: efeito agonista calculado como porcentagem versus estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00243] Figura 5B: efeito antagonista calculado como porcentagem de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00244] Figuras 6A e 6B, Figuras 7A e 7B, Figuras 8A e 8B, Figuras 9A e 9B, Figuras 10A e 10B: modelos BRET com Figuras A: modelo de dimerização de c-Met; e Figuras B: modelo de ativação de c-Met.

[00245] Figura 11: reconhecimento de c-Met por formas de 224G11 quiméricas e humanizadas.

[00246] Figura 12: Efeito de anticorpos de murino e quiméricos sobre proliferação induzida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Células NCI-H441 foram plaqueadas em meio livre de soro. 24 horas após plaqueamento m224G11 e [224G11]quim foram adicionados ou na ausência ou na presença de HGF. Setas pretas indicam as cavidades plaqueadas com células sozinhas ou na ausência (seta para a esquerda) ou na presença (seta para a direita) de HGF. Um IgG1 de murino (mIgG1) foi introduzido como um controle de isotipo.

[00247] Figura 13: Comparação *in vivo* de Mabs 224G11 quiméricos IgG1 e de murino em modelo de xenoenxertos NHCi-H441.

[00248] Figuras 14A e 14B: Efeito do Mab 224G11 de murino e de várias versões quiméricas e humanizadas deste anticorpo sobre proliferação induzida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Células NCI-H441 foram plaqueadas em meio livre de soro. Vinte e quatro horas após plaqueamento os anticorpos a serem testados foram adicionados

ou na ausência ou na presença de HGF. No painel (Figura 14A), as versões m224G11 de murino, IgG1 quimérico [224G11]quim, IgG1 humanizado [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3] foram mostradas. No painel (Figura 14B), o m224G1 de murino e várias formas quiméricas de IgG1 ([224G11]quim, [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim) foram apresentados. Setas pretas indicam as cavidades plaqueadas com células sozinhas ou na ausência (seta para a esquerda) ou na presença (seta para a direita) de HGF. Um IgG1 de murino foi introduzido como um controle negativo para atividade agonista. O m5D5 foi usado como um controle de agonista integral dependente da dose.

[00249] Figuras 15: Efeito do Mab 224G11 de murino e de várias versões quiméricas e humanizadas deste anticorpo sobre proliferação induzida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Células NCI-H441 foram plaqueadas em meio livre de soro. Vinte e quatro horas após plaqueamento os anticorpos a serem testados foram adicionados ou na ausência ou na presença de HGF. As formas quiméricas m224G11 de murino, [224G11] quim, quiméricas de IgG1 [224G11] [TH7 quim] e [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]) foram apresentadas. Setas pretas indicam as cavidades plaqueadas com células sozinhas ou na ausência (seta para a esquerda) ou na presença (seta para a direita) de HGF. Um IgG1 de murino foi introduzido como um controle negativo para atividade agonista. O m5D5 foi usado como um controle de agonista integral dependente da dose.

[00250] Figura 16: Comparação *in vivo* de Mabs 224G11 de murino, quiméricos e humanizados sobre o modelo de xenoenxertos NCI-H441.

[00251] Figura 17A: efeito agonista calculado como porcentagem versus estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00252] Figura 17B: efeito antagonista calculado como porcentagem de inibição da estimulação máxima de fosforilação de c-Met por HGF [100 ng/ml].

[00253] Figura 18: modelos BRET com modelo de ativação de c-Met.

[00254] Figura 19: Efeito de m224G11 e h224G11 sobre degradação de c-Met em células A549. A) Média de 4 experimentos independentes +/- s.e.m. B) Imagem de *Western blot* representativa dos 4 experimentos independentes realizados.

[00255] Figura 20: Efeito de m224G11 e h224G11 sobre degradação de c-Met em células NCI-H441. A) Média de 4 experimentos independentes +/- s.e.m. B) Imagem de Western blot representativo de 4 experimentos independentes realizados.

[00256] Figura 21: Ajuste de um ELISA para avaliar desprendimento de c-Met.

[00257] Figura 22: Avaliação *in vitro* de desprendimento de c-Met em células NCI-H441 tratadas por 5 dias com m224G11. mIgG1 é um anticorpo irrelevante usado como um controle de isotipo.

[00258] Figura 23: Avaliação *in vitro* de desprendimento de c-Met em linhagens de célula Hs746T, MKN45 e EBC-1 amplificadas tratadas por 5 dias com m224G11. mIgG1 é um anticorpo irrelevante usado como um controle de isotipo. PMA é um indutor de desprendimento usado como um controle positivo.

[00259] Figura 24: Avaliação *in vitro* de desprendimento de c-Met em linhagens de célula NCI-H441 e Hs746T, MKN45 e EBC-1 amplificadas tratadas por 5 dias com m224G11. mIgG1 é um anticorpo irrelevante usado como um controle de isotipo. PMA é um indutor de desprendimento usado como um controle positivo.

[00260] Figura 25: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula Hs746T.

[00261] Figura 26: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula NCI-H441. A) fosfo-ELISA e B) análise Western.

[00262] Figura 27: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula Hs578T. A) fosfo-ELISA e B) análise Western.

[00263] Figura 28: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula NCI-H125. A) fosfo-ELISA e B) análise Western.

[00264] Figura 29: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula T98G. A) fosfo-ELISA e B) análise Western.

[00265] Figura 30: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula MDA-MB-231. A) fosfo-ELISA e B) análise Western.

[00266] Figura 31: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em linhagem de célula PC3. A) fosfo-ELISA e B) análise Western.

[00267] Figura 32: Estudo de fosforilação intrínseca de h224G11 em células HUVEC.

[00268] Figura 33: Comparação *in vivo* do anticorpo 224G11 de murino do tipo selvagem com um Mabs 224G11[C2D5-7] de dobra engenheirada quimérico no modelo de xenoenxertos NCI-H441.

[00269] Figura 34: indução ADCC por h224G11 em ambas as células Hs746T e NCI-H441. Células Hs746T (A) ou NCI-H441 (B) marcadas com ^{51}Cr carregadas (quadrados em negrito) ou não (quadrados vazios) com h224G11 foram misturadas com razão diferente de células NK humanas e incubadas por 4 h. As células foram coletadas e cpm de ^{51}Cr liberado através de lise foi contada. Os resultados são postos em gráfico como porcentagem de lise contra a razão de célula efetora/alvo. NL para células não-carregadas.

[00270] Figura 35: tingimento de h224G11 em xenoenxertos de tumor que expressava vários níveis de c-Met (A: linhagem de célula am-

plificada Hs746T para c-Met; B: nível alto em NCI-H441 de expressão de c-Met e C: nível baixo em MCF-7 de c-Met).

Exemplo 1: Geração de anticorpos contra c-Met

[00271] Para gerar anticorpos anti-c-Met, camundongos BALB/c de 8 semanas de vida foram imunizados ou 3 a 5 vezes subcutaneamente com uma linhagem de célula transfectada CHO que expressa c-Met em sua membrana de plasma ($20x10^6$ células/dose/camundongo) ou 2 a 3 vezes com uma proteína de fusão de domínio extracelular de c-Met (10-15 µg/dose/camundongo) (R&D Systems, N° de catálogo 358MT) ou fragmentos desta proteína recombinante misturados com adjuvante de Freund completo para a primeira imunização e adjuvante de Freund incompleto para as seguintes. Protocolos mistos onde os camundongos receberam ambas as células CHO-c-Met e proteínas recombinantes foram também realizados. Três dias antes da fusão celular, os camundongos foram reforçados i.p. ou i.v. com a proteína recombinante ou fragmentos. Então os baços dos camundongos foram coletados e fundidos como células mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) e submetidos à seleção HAT. Quatro fusões foram realizadas. Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais, especialmente de origem de murino, é possível se referir às técnicas que são descritas em particular no manual "Antibodies" (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 726, 1988) ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Kohler e Milstein (*Nature*, 256:495-497, 1975).

[00272] Os hibridomas obtidos foram inicialmente avaliados através de ELISA na proteína recombinante c-Met e então através de análise FACS em linhagens de célula A549 NSCLC, BxPC3 pancreática e U87-MG glioblastoma para assegurar que os anticorpos produzidos serão capazes de também reconhecer o receptor nativo em células de tumor. Reatores positivos nestes 2 testes foram amplificados, clonados

e um conjunto de hibridomas foi recuperado, purificado e avaliado quanto à sua habilidade em inibir proliferação celular *in vitro* no modelo BcPC3.

[00273] Para este propósito, 50 000 células BxPC3 foram plaqueadas em placas de 96 cavidades em meio RPMI, L. Glutamina 2 mM, sem SVF. 24 horas após plaqueamento, os anticorpos a serem testados foram adicionados em uma concentração final variando de 0,0097 a 40 µg/ml 60 min antes da adição de 100 ng/ml de hHGF. Após 3 dias, as células foram pulsadas com 0,5 µCi de [^{3}H]timidina por 16 horas. A magnitude de [^{3}H]timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido tricloroacético foi quantificada através de contagem por cintilação líquida. Os resultados foram expressos como dados brutos para avaliar realmente o efeito agonista intrínseco de cada Mab.

[00274] Então os anticorpos inibindo pelo menos 50% de proliferação foram avaliados quanto à sua atividade sobre dimerização de c-Met e análise BRET de ativação em células transfectadas. A atividade do receptor c-Met foi quantificada medindo o recrutamento de molécula de sinalização Gab1 em c-Met ativado. Para este propósito, linhagens de célula estáveis CHO expressando C-Met-Rluc ou C-Met-Rluc e C-Met-K1100A-YFP para dimerização de c-Met ou C-Met-Rluc e uma forma mutante de Gab1 [Maroun e outros, *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19:1784-1799] fundida a YFP para ativação de c-Met foram geradas. As células foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades em meio de cultura DMEM-F12/FBS 5% um ou dois dias antes dos experimentos BRET. As células foram primeiro culturadas a 37º C com CO_2 5% a fim de permitir ligação celular à placa. As células foram então coletadas com 200 µl de DMEM/cavidade da noite para o dia. Imediatamente antes do experimento, DMEM foi removido e as células rapidamente lavadas com PBS. As células foram incubadas em PBS na presença ou ausência de anticorpos a serem testados ou compostos

de referência, 10 min a 37º C antes da adição de coelenterazina com ou sem HGF em um volume final de 50 µl. Após incubação por mais 10 minutos a 37º C, aquisição de emissão de luz a 485 nm e 530 nm foi iniciada usando o luminômetro Mithras (Berthold) (1s/comprimento de onda/cavidade repetido 15 vezes).

[00275] A razão BRET tinha sido anteriormente definida [Angers e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:3684-3689] como: [(emissão a 530 nm) – (emissão a 485 nm) X Cf] / (emissão a 485 nm), onde Cf corresponde a (emissão a 530 nm) / (emissão a 485 nm) para células expressando proteína de fusão Rluc sozinha nas mesmas condições experimentais. Simplificação desta equação mostra que a razão BRET corresponde à razão 530/485 obtida quando os dois parâmetros estavam presentes, corrigida pela razão 530/485 obtida sob as mesmas condições experimentais, quando apenas o contraparte fundido à luciferase de *R. reniformis* estava presente no ensaio. Por questão de leitura, os resultados são expressos em unidades milliBRET (mBU); mBU corresponde à razão BRET multiplicada por 1000.

[00276] Após este segundo teste *in vitro*, o anticorpo 224G11 i) sem atividade intrínseca como uma molécula integral no teste funcional de proliferação, (ii) inibindo significantemente proliferação de BxPC3 e iii) inibindo dimerização de c-Met foi selecionado. Nos experimentos, o Mab 5D5, gerado pela Genentech, e disponível da ATCC, foi adicionado como um controle para a atividade agonística intrínseca.

Exemplo 2: Processo de humanização de Mab 224G11 de camundongo através de enxerto de CDR

1º) Humanização do domínio variável de cadeia leve (VL)

[00277] Como uma etapa preliminar, a sequência de nucleotídeo de 224G11 VL foi comparada com as sequências de gene de linhagem germinativa de murino incluídas no banco de dados IMGT (http://imgt.cines.fr). Genes de linhagem germinativa IGKV3-5*01 e

IGKJ*01 de murino mostrando uma identidade de sequência de 99,31% para a região V e 94,28% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação a essas homologias altas, a sequência de nucleotídeo de 224G11VL foi usada diretamente para pesquisar homologias humanas, ao invés de linhagens germinativas de camundongo correspondentes.

[00278] Em uma segunda etapa, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com o 224G11VL foi pesquisado para identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR. Para otimização da seleção, alinhamentos entre as sequências de aminoácido foram realizados. O gene da linhagem germinativa IGKV4-1*01 humana deu uma identidade de sequência de 67,30%, mas mostrou um comprimento diferente de CDR1 (10 aminoácidos em 224G11 VL e 12 aminoácidos em IGKV4-1*01). Para a região J, o gene da linhagem germinativa IGKJ4*02 humana (identidade de sequência de 77,14%) foi selecionado.

[00279] Em uma etapa seguinte, regiões de CDR de 224G11 VL de camundongo foram enxertadas nas sequências de estrutura principal humanas selecionadas acima. Cada posição de aminoácido foi analisada quanto a vários critérios tal como participação em interface VH/VL, em ligação de antígeno ou em estrutura de CDR, localização do resíduo em estrutura 3D do domínio variável, âncoras de CDR, resíduos pertencentes à zona Vernier. Três versões humanizadas, correspondendo à SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 10, foram construídas e contendo respectivamente quatro (4, 39, 40, 84), dois (39, 40) ou um (40) resíduos de murino em suas regiões FR e as CDRs correspondendo a 224G11 VL de camundongo.

2º Humanização do domínio variável de cadeia pesada (VH)

[00280] Como uma etapa preliminar, a sequência de nucleotídeo de 224G11 VH foi comparada com as sequências de genes de linha ger-

minativa de murino incluídas no banco de dados IMGT (http://imgt. cines.fr).

[00281] Os genes das linhagens germinativas IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 e IGHJ2*01 com uma identidade de sequência de 92,70% para a região V, 75,00% para a região D e 89,36% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação a estas homologias altas, foi decidido usar diretamente as sequências de nucleotídeo de 224G11 VH para pesquisar homologias humanas, ao invés de linhagens germinativas de camundongo correspondentes.

[00282] Em uma segunda etapa, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com o 224G1 VH foi pesquisado para identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR. Para esta finalidade, a sequência de nucleotídeo de 224G11 VH foi alinhada com as sequências de genes de linhagem germinativa humana pertencentes ao banco de dados IMGT. A sequência de IGHV1-2*02 V exibia uma identidade de sequência de 75,00% no nível de nucleotídeo e 64,30% no nível de aminoácido. Procura por homologias com a região J levou à identificação de gene de linhagem germinativa IGHJ4*04 com uma identidade de sequência de 78,72%.

[00283] Em uma etapa seguinte, regiões de CDR de 224G11 VH de camundongo foram enxertadas nas sequências de estrutura principal humana selecionadas. Cada posição do aminoácido foi analisada quanto a vários critérios tal como participação em interface VH/VL, em ligação de antígeno ou em estrutura de CDR, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, âncoras de CDR, resíduos pertencentes à zona Vernier. Uma forma integralmente humanizada, correspondendo à SEQ ID N°4, foi construída; ela contém exclusivamente resíduos humanos em suas regiões FR e as CDRs correspondendo a 224G1 VH de camundongo.

Exemplo 3: Engenharia de mutantes de dobra aperfeiçoados

[00284] É bem conhecido pelo versado na técnica que a região de dobra participa fortemente na flexibilidade do domínio variável de imunoglobulinas (vide Brekke e outros, 1995; Roux *et. al.*, 1997). Durante o processo de quimerização de Mab 224G11, o domínio constante de camundongo IGHG1 foi substituído pela porção IGHG1 equivalente de origem humana. Uma vez que a sequência de aminoácido da região de dobra era altamente divergente, "murinização" da região de dobra foi realizada a fim de manter seu comprimento e rigidez. Uma vez que a região de dobra IGHG2 humana corresponde ao homólogo mais próximo da dobra de IGHG1 de camundongo, esta sequência foi bem considerada. Uma série de 7 sequências de dobra diferentes foi construída (SEQ ID NOs. 22 a 28) através da incorporação de porções das dobras IGHG1 de camundongo e IGHG2 humana na porção de dobra IGHG1 humana.

[00285] Outra série de mutantes de dobra foi projetada e construída (SEQ ID NOs. 58 a 72) para avaliar a influência de uma cisteína adicional e sua posição ao longo do domínio de dobra, deleção de 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos ao longo do domínio de dobra e uma combinação desses dois parâmetros (adição de cisteína e deleção de aminoácido).

Exemplo 4: Produção de Mab 224G11 humanizado e formatos de Mab de dobra engenheirada

[00286] Todas as formas de Mab descritas acima contendo regiões de dobra quiméricas, humanizadas e/ou engenheiradas foram produzidas quando da transfecção transiente e usando o sistema HEK293/EBNA com um vetor de expressão pCEP4 (InVitrogen, US).

[00287] As sequências de nucleotídeo inteiras correspondendo às versões humanizadas do domínio variável de cadeias leve de Mab 224G11 (SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 e SEQ ID N° 20) e pesada (SEQ ID N° 14) foram sintetizadas através de síntese de gene global

(Genecust, Luxembourg). Elas foram subclonadas em vetor pCEP4 (InVitrogen, US) carregando a sequência de codificação inteira do domínio constante [CH1-Hinge-CH2-CH3] de uma imunoglobulina IgG1 ou IgG2 humana. Modificação da região de dobra foi realizada trocando um fragmento de restrição {Nhe1I-BcI1} pela porção equivalente carregando as modificações necessárias, cada respectivo fragmento {Nhe1-BcI1} sendo sintetizado através de síntese de gene global (Genecust, LU). Todas as etapas de clonagem foram realizadas de acordo com as técnicas de biologia molecular convencionais conforme descrito no *Laboratory Manual* (Sambrook e Russel, 2001) ou de acordo com as instruções do fabricante. Cada construto genético foi integralmente validado através de sequenciamento de nucleotídeo usando o Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, US) e analisado usando um Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, US).

[00288] Células EBNA HEK293 adaptadas para suspensão (InVitrogen, USA) foram rotineiramente cultivadas em frascos de 250 ml em 50 ml de meio livre de soro Excell 293 (SAFC Biosciences) suplementado com glutamina 6 mM em um agitador orbital (velocidade de rotação 110 rpm). Transfecção transiente foi realizada com $2,10^6$ células/ml usando polietilenoimina de 25 kDa linear (PEI) (Polysciences) preparada em água em uma concentração final de 1 mg/ml misturada e DNA de plasmídeo (concentração final de 1,25 µg/ml para razão de plasmídeo de cadeia pesada para leve de 1:1). 4 horas pós-infecção, a cultura foi diluída com um volume de meio de cultura fresco para atingir uma densidade celular final de 10^6 células/ml. Processo de cultivo foi monitorado com base em viabilidade celular e produção de Mab. Tipicamente, as culturas foram mantidas por 4 a 5 dias. Mabs foram purificados usando uma abordagem de cromatografia convencional em uma resina de Proteína A (GE Healthcare, US). Todas as formas dife-

rentes de Mabs foram produzidas em níveis adequados com avaliações funcionais. Os níveis de produtividade estão tipicamente variando entre 15 e 30 mg/ml de Mabs purificados.

Exemplo 5: Avaliação do estado de fosforilação de c-Met através de um ensaio ELISA específico de Fosfo-c-Met

[00289] Este ensaio funcional permite monitorar a modulação do estado de fosforilação de c-Met por Mabs sozinhos ou na copresença de HGF.

[00290] As células A549 foram semeadas em uma placa de 12MW em meio de crescimento completo [F12K + FCS 10%). As células foram deixadas em jejum por 16 horas antes da estimulação com HGF [100 ng/ml], e cada Mab a ser testado foi adicionado em sua concentração final de 30 µg/ml 15 minutos antes da estimulação com ligante. Tampão de lise gelado foi adicionado 15 minutos após a adição de HGF para parar a reação de fosforilação. As células foram mecanicamente liberadas e os lisatos celulares foram coletados através de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4º C e correspondem à fase de sobrenadante. O teor de proteína foi quantificado usando um BCA kit (Pierce) e armazenado a -20º C até uso. O estado de fosforilação de c-Met foi quantificado através de ELISA. Um Mab anti-c-Met de cabra (R&D, ref. AF276) foi usado como um anticorpo de captura (revestimento da noite para o dia a 4º C) e após uma etapa de saturação com um tampão de TBS-BSA 5% (1 hora em temperatura ambiente (RT)), 25 µg de lisatos de proteína foram adicionadas a cada cavidade da placa de 96MW revestida. Após incubação por 90 minutos em RT, as placas foram lavadas quatro vezes e o anticorpo de detecção foi adicionado (Mab anti-fosfo-c-Met, direcionado contra os resíduos Tyr fosforilados nas posições 1230, 1234 e 1235). Após uma incubação de 1 hora adicional e 4 lavagens, um anticorpo anticoelho acoplado a HRP (Biosource) foi adicionado por 1 hora em RT, e a detecção de

luminescência foi realizada através da adição de Luminol. Leituras de luminescência foram em uma leitora de placa multimodo Mithras LB920 (Berthold).

[00291] Ambos os níveis de fosforilação do receptor c-Met basal e induzida por HGF [100 ng/ml] não foram afetados nem por tratamento com PBS nem pela adição de Mabs de camundongo ou humanos que não se direcionavam ao receptor c-Met humano (figura 1). Por outro lado, Mab 224G11 de camundongo (m) inibiu fortemente fosforilação de c-Met induzida por HGF [100 ng/ml] (Figura 2B) sem alterar a fosforilação do receptor (figura 2A). Surpreendentemente, a forma quimérica de Mab 224G11 (224G11quim/IgG1), significando domínio variável (VH+VL) de m224G11 combinado com domínio constante humano IgG1/kappa, deu atividade agonista forte (17% de efeito de HGF máximo, Figura 2A) associada com uma eficácia antagonística reduzida (54% de inibição de efeito de HGF máximo comparado com o m224G11 que dá 75% de inibição do efeito máximo de HGF, figura 2B). Três formas humanizadas de Mab224G11, [224G11]Hz1/IgG1, [224G11]Hz2/IgG1 e [224G11]Hz3/IgG1, também construídas em uma estrutura principal IgG1/kappa humana, também deram eficácia antagonística menor e atividade agonista significante (11 a 24% de nível de HGF máximo) comparado com 224G11 de camundongo (figuras 2A e 2B). Uma série de versões engenheiradas do domínio de dobra de cadeia pesada foi construída e ensaiada no ensaio de fosforilação de receptor c-Met. Conforme mostrado na figura 3A, uma redução importante do efeito agonista associado com o isotipo hIgG1/kappa foi observada para ambos o construto baseado em IgG2 e para construtos de IgG1/kappa engenheirados [NH, MUP9H e TH7]. Um aumento concomitante em eficácia antagonística foi também obtido. O mutante de dobra TH7 baseado em hIgG1/kappa, com a sequência mais humana, foi selecionado para completar o processo de humanização. Em uma

etapa seguinte, três versões humanizadas de domínio variável de Mab 224G11 foram geradas através da combinação de um domínio constante de dobra engenheirada baseado em IgG2/kappa ou IgG1/kappa humano. Para os construtos humanizados hIgG2/kappa, a versão humanizada Hz3 deu agonismo forte (figura 4A) e para todas as três versões humanizadas, a eficácia antagonística estava abaixo daquela observada com Mab 224G11 de murino e comparável com o Mab baseado em hIgG1 quimérico (56-57% de inibição do efeito de HGF, Figura 4B). Por outro lado, combinação das três versões humanizadas Hz1, Hz2 ou Hz2 com o mutante IgG1/Th7 restaurou quase que completamente as propriedades de Mab 224G11 de camundongo em termos de atividade agonista fraca (5-6% de feito de HGF) e eficácia antagonística forte (68 a 72% de inibição do efeito de HGF) de fosforilação do receptor c-Met (figuras 5A e 5B). Essas variantes foram altamente aperfeiçoadas comparado com Mab 224G11 baseado em IgG1, mas também com formas humanizadas baseadas em IgG2.

[00292] Uma segunda série de versões engenheiradas do domínio de dobra de cadeia pesada foi construída e ensaiada no ensaio de fosforilação do receptor c-Met. Conforme mostrado na figura 17A, todas aquelas novas versões (c224GI I[C2], c224GI I[C3], c224GI I[C5], c224GI I[C6], c224GI I[C7], c224GI I[ΔI-3], c224GI I[C7Δ6], c224GI I[C6Δ9], c224GI I[C2Δ5-7], c224GI I[C5Δ2-6], c224GI I[C9Δ2-7] e c224GI I[Δ5-6-7-8]) exibiram efeito agonista mais fraco do que c224G11 uma vez que suas atividades agonistas estão compreendidas entre 6 e 14% do efeito de HGF comparado com 23% para c224G11. Como c224G11[TH7], todas as novas versões exibiram um aumento concomitante em eficácia de antagonista [figura 17B]. Esses resultados mostraram que engenharia do domínio de cadeia pesada por mutação por ponto e/ou deleção poderia modificar as propriedades agonísticas/antagonísticas de um anticorpo.

Exemplo 6: Análise BRET

[00293] Em um primeiro conjunto de experimentos, havia controle que IgG1 de camundongo, IgG1 humano e IgG2 humano irrelevantes não tinham nenhum efeito de sinal de BRET induzido por HGF em ambos os modelos BRET (experimento representativo de 12 experimentos independentes; figura 6). Esses Mabs são em seguida citados como controles.

[00294] O efeito de uma forma quimérica de IgG1 de Mab 224G11 de camundongo ([224G11]quim) sobre ambos os modelos BRET de dimerização de c-Met e ativação de c-Met foi avaliado. Enquanto o Mab 224G11 de camundongo inibiu 59,4% do sinal de BRET induzido por HGF em um modelo de dimerização de c-Met, Mab [224G11]quim inibiu apenas 28,9% (figura 7A). O anticorpo [224G11]quim foi também menos eficaz na inibição de ativação de c-Met induzida por HGF uma vez que os anticorpos [224G11]quim e m224G11 inibiram respectivamente 34,5% e 56,4% de sinal de BRET induzido por HGF (figura 7B). Além disto, m224G11 sozinho não tinha nenhum efeito sofre a ativação de c-Met enquanto [224G11]quim tinha um efeito agonista parcial sobre a ativação de c-Met correspondendo a 32,9% de sinal induzido por HGF. Este efeito agonista parcial do [224G11]quim foi também visto em modelo BRET de dimerização de c-Met uma vez que [224G11] quim sozinho induziu um aumento BRET correspondendo a 46,6% de sinal induzido por HGF versus 21,3% para m224G11 (figura 7A).

[00295] Nas figuras 8A e 8B, formas quiméricas mutadas de dobra de anticorpo 224G11 mostraram um efeito inibidor maior sobre sinal de BRET induzido por HGF do que [224G11]quim uma vez que eles mostraram uma inibição de 59,7%, 64,4%, 53,2% e 73,8% de inibição do sinal de BRET de ativação induzida por HGF (figura 8B) e 61,8%, 64,4%, 52,5% e 64,4% de inibição de sinal de BRET de dimerização de c-Met induzida por HGF (Figura 8A) para [224Gl l][MH quim],

[224G11][MUP9H quim], [224Gl l][MMCH quim] e [224G11][TH7 quim], respectivamente. Contrário a [224G11]quim, que tinha um efeito agonista parcial sobre ativação de c-Met, formas quiméricas mutadas de dobra de anticorpo 224G11 não mostraram nenhum efeito significante sobre ativação de c-Met sozinhas (5,1%, 7,6%, -2,0% e -6,9%, respectivamente) conforme observado para m224G11.

[00296] Na figura 9B, tal como o [224G11] [TH7 quim], as 3 versões humanizadas de anticorpo IgG1 224G11 com a dobra TH7 não induziram nenhum aumento significante de sinal BRET em modelo de ativação quanto testadas sozinhas e mostraram uma inibição forte de sinal BRET induzido por HGF: 59,9%, 41,8% e 57,9% para as formas Hz1, Hz2 e Hz3. Além disto, [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz2] e [224Gl 1] [TH7 Hz3] inibiram o sinal BRET induzido por HGF em modelo de dimerização de 52,2%, 35,8% e 49,4%, respectivamente (figura 9A).

[00297] Contrário a [224G11]quim, a forma quimérica de anticorpo IgG2 224G11 ([224G11] [IgG2 quim]) não mostrou nenhum efeito agonista sozinho e inibiu 66,3% do efeito de HGF sobre o modelo de ativação de c-Met (figura 10B). No modelo de dimerização de c-Met, [224G11][IgG2 quim] inibiu 62,4% do sinal de BRET induzido por HGF (figura 10A).

[00298] A eficácia agonista da segunda série de versões engenheiradas do domínio de dobra de cadeia pesada foi avaliada em modelo BRET de ativação de c-Met (figura 18). Em contraste com c224G11, que tinha um efeito agonista parcial sobre ativação de c-Met, as formas quiméricas mutadas na dobra de anticorpo 224G11 c224Gl l[C2], c224Gl l[C3], c224Gl l[C5], c224Gl l[C6], c224Gl l[C7], c224Gl l[Δl-3], c224Gl l[C7Δ6], c224Gl l[C6Δ9], c224Gl l[C2Δ5-7], c224Gl l[C5Δ2-6], c224Gl l[C9Δ2-7] e c224Gl l[Δ5-6-7-8] não mostraram nenhum efeito significante sobre a ativação de c-Met sozinhas.

Exemplo 7: Reconhecimento de c-Met por formas de 224G11 quiméricas e humanizadas

[00299] Um ELISA direto tinha sido ajustado para determinar a habilidade de ligação das várias formas quiméricas e humanizadas no c-Met recombinante. Em suma, c-Met quimérico recombinante da R&D Systems foi revestido a 1,25 µg/ml em placas Immunlon II de 96 cavidades. Após uma incubação da noite para o dia a 4º C, as cavidades foram saturadas com uma solução de gelatina 0,5%/PBS. As placas foram então incubadas por 1 hora a 37º C antes da adição de diluições 2 vezes de anticorpos a serem testados. As placas foram incubadas mais uma hora antes da adição de HRP de IgG anti-camundongo de cabra para detecção do anticorpo de murino e uma HRP de cadeia leve kappa anti-humano de cabra para reconhecimento de anticorpos quimérico e humanizado. As placas foram incubadas por uma hora e o substrato de peroxidase TMB Uptima foi adicionado para 5 mn antes da neutralização com H_2SO_4 1M. Os resultados apresentados na figura 11 mostraram que todas as formas testadas eram comparáveis para reconhecimento de c-Met.

Exemplo 8: Efeito de 224G11 de murino e quimérico sobre proliferação induzida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*

[00300] Células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, RU), FCS 10% (Invitrogen Corporation), L-Glutamina 1% (Invitrogen Corporation). Para ensaios de proliferação, as células foram divididas 3 dias antes do uso de maneira que elas estavam em fase confluente de crescimento antes do plaqueamento. As células NCI-H441 foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em uma densidade de $3,75x10^4$ células/cavidade em 200 µl de meio livre de soro (meio RPMI 1640 mais L-Glutamina 1%). Vinte e quatro horas depois do plaqueamento, os anticorpos a serem testados foram adicionados a

NCI-H441 e incubados a 37º C por trinta minutos antes da adição de HGF em uma concentração final de 400 ng/ml (5 nM) por mais 142 horas. A faixa de dose testada para cada anticorpo é de a partir de 10 a 0,0097 µm/ml (concentração final em cada cavidade). Neste experimento, um Mab IgG1 de murino foi adicionado como um controle de isotipo de murino e os anticorpos testados foram os seguintes: m224G11 e sua forma quimérica IgG1 humana identificada como [224G1]quim. As cavidades plaqueadas com células sozinhas -/+ HGF foram também incluídas. Então as células foram pulsadas com 0,25 µCi de [^{3}H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suécia) por 7 horas e 30 minutos. A magnitude da [^{3}H]Timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido acético foi quantificada através de contagem por cintilação líquida. Os resultados são expressos como dados cpm não transformados para avaliar melhor a atividade agonista intrínseca potencial que poderia ocorrer com Mabs anti-cMet quando adicionados sozinhos à célula de tumor.

[00301] Os resultados descritos na figura 12 demonstraram que, conforme esperado, o anticorpo de murino m224G11 não mostrou nenhum efeito agonista quando adicionado sozinho a células de câncer qualquer que seja a dose. Nenhuma inibição significante da proliferação induzida por HGF foi observada com o controle de isotipo com relação às variações de cpm observadas para este composto neste experimento. Quando adicionado sozinho, o anticorpo m224G212 não mostrou nenhum efeito agonista comparado com o Mab controle de isotipo mIgG1 ou células sozinhas. Uma atividade antiproliferativa dependente da dose atingindo 78% foi observada para m224G11 (cálculo da % de inibição: 100[(células de cpm+Mab a ser testado-base de cpm média mIgG1) x 100 / (células de cpm médias + HGF – células de cpm médias sozinhas)]). Surpreendentemente, a forma quimérica dos Mabs 224G11 induziu um efeito agonista dependente da dose significantes

quando adicionados sozinhos. Este efeito agonista teve um impacto sobre a inibição *in vitro* de proliferação induzida por HGF que mudou de 78% para o 224G11 de murino para 50% para sua forma quimérica. Para determinar se tal atividade agonista intrínseca *in vitro* "menor" era compatível com um efeito *in vivo* sem modificação, ambos os m224G11 e [224G11]quim foram produzidos para teste *in vivo*. Como, em estudos anteriores, a dose de 30 µg/camundongo tinha demonstrado uma atividade *in vivo* significante, esta dose foi selecionada para avaliação *in vivo.*

Exemplo 9: Comparação *in vivo* de Mabs 224G11 de murino e quimérico no modelo de xenoenxertos NCI-H441

[00302] NCI-H44I é derivado de adenocarcinoma pulmonar papilar, expressa níveis altos de c-met e demonstra fosforilação constitutiva de RTK de c-Met.

[00303] Para avaliar o efeito *in vivo* de anticorpos sobre o modelo de xenoenxertos NCI-H441, camundongos atímicos de seis a oito semanas de vida foram alojados em gaiolas com filtro em cima esterilizadas, mantidos em condições estéreis e manipulados de acordo com as orientações Francesa e Europeias. Os camundongos foram injetados subcutaneamente com $9x10^6$ células. Então, seis dias após o implante, os tumores eram mensuráveis (aproximadamente 100 mm^3), os animais foram divididos em grupos de 6 camundongos com tamanho de tumor comparável e tratados primeiro com uma dose de carga de 60 µg de anticorpo/camundongo e então duas vezes por semana com 30 µg/dose de cada anticorpo a ser testado. Os camundongos foram enviados para a observação de taxa de crescimento de xenoenxertos. O volume do tumor foi calculado através da fórmula: π (Pi)/6 X comprimento X largura X altura. Os resultados descritos na figura 13 demonstram que o Mab de murino destituído de atividade agonista *in vivo* se comportou, como esperado, como antagonista potencial mesmo

na dose mais baixa testada. Em contraste com o que foi observado com o Mab de murino, o quimérico mostrou uma atividade *in vivo* muito transiente e o tumor escapou completamente do tratamento em injeção D20 pós-célula. Este experimento demonstra claramente que o aumento de efeito agonista *in vivo* que resultou em uma diminuição de atividade agonista foi também responsável por uma perda *in vivo* significante de atividade antagonista.

Exemplo 10: Efeito do Mab 224G11 de murino e de várias versões quiméricas e humanizadas deste anticorpo sobre proliferação induzida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*

[00304] Células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente culturadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, RU), FCS 10% (Invitrogen Corporation), L-Glutamina 1% (Invitrogen Corporation). Para ensaios de proliferação, as células foram divididas 3 dias antes do uso de maneira que elas estavam em fase confluente de crescimento antes do plaqueamento. As células NCI-H441 foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em uma densidade de $3,75x10^4$ células/cavidade em 200 µl de meio livre de soro (meio RPMI 1640 mais L-Glutamina 1%). Vinte e quatro horas depois do plaqueamento, os anticorpos a serem testados foram adicionados a NCI-H441 e incubados a 37º C por trinta minutos antes da adição de HGF em uma concentração final de 400 ng/ml (5 nM) por mais 142 horas. A faixa de dose testada para cada anticorpo é a partir de 10 a 0,0097 µm/ml (concentração final em cada cavidade). Neste experimento, um Mab de IgG1 de murino foi adicionado como um controle de isotipo de murino e como um controle negativo agonista. Os anticorpos testados foram os que seguem: i) m224G11, ii) suas formas quiméricas de IgG1 humano respectivamente identificadas como [224GI 1] quim, [224GI 1] [MH quim], [224GI 1] [MUP9H quim], [224GI 1] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim] iii) suas formas de IgG1 humanizadas res-

pectivamente descritas como [224Gl 1] [Hzl], [224Gl 1] [Hz2], [224Gl 1] [Hz3]. As cavidades plaqueadas com células sozinhas -/+ HGF foram também incluídas. O anticorpo integral 5D5 da Genentech comercialmente disponível no ATCC como uma linhagem de célula de hibridoma foi introduzido como um controle positivo de agonista integral e em seguida chamado m5D5. As células foram pulsadas com 0,25 μCi de [^{3}H]Timidina (Amershcam Bioscience AB, Uppsala, Suécia) por 7 horas e 30 minutos. A magnitude de [^{3}H]Timidina incorporada em DNA insolúvel de ácido tricloroacético foi quantificada através de contagem com cintilação líquida. Os resultados são expressos como dados de cpm não transformados para melhor avaliar a atividade agonista intrínseca potencial que poderia ocorrer com Mabs anti-c-Met quando adicionados sozinhos à célula de tumor.

[00305] Os resultados descritos na figura 14A demonstraram que, conforme esperado, nem o controle de isotipo nem o m224G11 mostrou nenhuma atividade agonista sobre proliferação de NCI-H441. O controle de isotipo era sem efeito sobre proliferação de célula induzida por HGF enquanto m224G11 mostrou uma inibição de 66% quando adicionado em uma concentração final de 10 μg/ml. O m5D5 usado como um controle de agonista mostrou, conforme esperado, um efeito agonista dependente da dose integral quando adicionado sozinho às células. Como já observado, o Mab [224G11] quim mostrou um efeito agonista dependente da dose significante e uma atividade inibidora menor desta forma quimérica foi observada: 19% ao invés de 66% para a forma de muriN° Quando adicionados sozinhos, os 3 Mabs humanizados de IgG1 demonstraram efeitos agonistas dependentes da dose comparado com a forma m224G11. [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2] e [224G11] [Hz3] tinham atividades antagonistas comparáveis cerca de 46, 30 e 35%. Essas atividades são significantemente menores do que aquelas observadas para m224G11. Na Figura 14B, várias formas

quiméricas de IgG1foram testadas. Comparado com a forma [224G11] quim que mostrou um efeito agonista dependente da dose quando adicionado sozinho a células NCI-H441, as formas [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224Gl 1] [TH7 quim] eram sem efeito agonista intrínseco significante. Sua atividade antagonista foi maior do que aquela observada para o Mab m224G11 (57%) com inibição atingindo 79, 78, 84 e 93%, respectivamente para [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim] e [224G11] [TH7 quim].

Exemplo 11: Efeito *in vivo* de várias formas humanizadas IgG1 do Mab 224G11

[00306] Células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente culturadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, RU), FCS 10% (Invitrogen Corporation), L-Glutamina 1% (Invitrogen Corporation). Para ensaios de proliferação, as células foram divididas 3 dias antes do uso de maneira que elas estavam em fase confluente de crescimento antes do plaqueamento. As células NCI-H441 foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de 96 cavidades em uma densidade de $3,75x10^4$ células/cavidade em 200 µl de meio livre de soro (meio RPMI 1640 mais L-Glutamina 1%). Vinte e quatro horas depois do plaqueamento, os anticorpos a serem testados foram adicionados a NCI-H441 e incubados a 37º C por trinta minutos antes da adição de HGF em uma concentração final de 400 ng/ml (5 nM) por mais 142 horas. A faixa de dose testada para cada anticorpo é a partir de 10 a 0,0097 µm/ml (concentração final em cada cavidade). Neste experimento, um Mab IgG1 de murino foi adicionado como um controle negativo para atividade agonista e os anticorpos testados foram os que seguem: i) m224G11, ii) suas formas quiméricas de IgG1 humano respectivamente identificadas como [224G11] quim, [224G11] [TH7 quim), iii) suas formas de IgG1 humanizadas respectivamente descritas como

[224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. As cavidades plaqueadas com células sozinhas -/+ HGF foram também incluídas. O anticorpo integral 5D5 da Genentech comercialmente disponível na ATCC como uma linhagem de célula de hibridoma foi introduzido como um controle positivo para agonista integral e em seguida chamado m5D5. Então as células foram pulsadas com 0,25 µCi de [^{3}H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suécia) por 7 horas e 30 minutos. A magnitude de [^{3}H]Timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido trifluoracético foi quantificada através de contagem com cintilação líquida. Os resultados são expressos como dados de cpm não-transformados para avaliar melhor a atividade agonista intrínseca potencial que poderia ocorrer com Mabs anti-c-Met quando adicionados sozinhos à célula de tumor.

[00307] A figura 15 mostrou que o Mab m224G11 mostrou o efeito inibidor comum (74% de inibição). A forma de IgG1 quimérica (224G11] quim tinha conforme esperado um efeito agonista intrínseco dependente da dose e um efeito agonista menor comparado com a forma de murino: 33% versus 74% de inibição. O [224G11] [TH7 quim] tinha uma atividade agonista muito fraca neste experimento. No entanto, ele mostrou um efeito inibidor alto (81%) próximo a um notado para o Mab de muriN° As 2 formas humanizadas não tinham efeito agonista intrínseco e tinham uma atividade antagonista próxima àquelas observadas para o Mab de murino ou ao [224G11] [TH7 quim] com respectivamente 67 e 76% de inibição para [224G11] [TH7] e [224G11] [TH7 Hz3].

Exemplo 12: Comparação *in vivo* de Mabs 224G11 de murino, quiméricos e humanizados carregando a dobra do tipo selvagem ou engenheirada TH7 (modelo de xenoenxertos NCI-H441).

[00308] NCI-H441 é derivado de adenocarcinoma pulmonar papilar, expressa níveis altos de c-Met e demonstra fosforilação constitutiva de RTK de c-Met.

[00309] Para avaliar a necessidade de engenharia de dobra para proteger a atividade *in vivo* do anticorpo de murino 224G11, camundongos atímicos de seis a oito semanas de vida foram alojados em gaiolas com filtro em cima esterilizadas, mantidos em condições estéreis e manipulados de acordo com as orientações Francesa e Europeias. Os camundongos foram injetados subcutaneamente com $9x10^6$ células NCI-H441. Então, seis dias após o implante, os tumores eram mensuráveis (aproximadamente 100 mm^3), os animais foram divididos em grupos de 6 camundongos com tamanho de tumor comparável e tratados primeiro com uma dose de carga de 2 mg de anticorpo/ camundongo e então duas vezes por semana com 1 mg/dose de cada anticorpo a ser testado. Dez anticorpos foram avaliados neste experimento incluindo o m224G11, a forma quimérica mostrando a dobra do tipo selvagem (c224G11), a forma quimérica engenheirada TH7 (224G11 [TH7 quim]), três formas humanizadas carregando a dobra do tipo selvagem (224G11[IgG1 Hz1], 224G11 [IgG1 Hz2] e 224G11[IgG1 Hz3) e as três formas engenheiradas TH7 correspondentes (224G11 [TH7 HzI], 224G11[TH7 Hz2] e 224G11[TH7 Hz3]). Os camundongos foram enviados para a observação de taxa de crescimento de xenoenxertos. O volume do tumor foi calculado através da fórmula: π (Pi)/6 X comprimento X largura X altura.

[00310] Os resultados descritos na figura 16 demonstram que o Mab de murino destituído de qualquer atividade agonista *in vitro* se comportou, como esperado, como antagonista *in vivo* potente. Em contraste com o que foi observado com o Mab de murino, ambas as formas quimérica e humanizada carregando a dobra do tipo selvagem mostraram apenas uma atividade *in vivo* muito transiente. Em quaisquer casos a substituição da dobra do tipo selvagem pela engenheirada TH7 resultou em uma restauração completa da atividade *in vivo* observada com anticorpos de murino. Este experimento demonstra cla-

ramente que o aumento de efeito agonista *in vitro* que resultou em uma diminuição de atividade antagonista era também responsável por uma perda *in vivo* significante de atividade antagonista. Ele também demonstra que o uso de uma região engenheirada TH7 ao invés do tipo selvagem é necessário para manter as propriedades *in vivo* do Mab de murino.

Exemplo 13: Efeito de m224G11 e sua forma humanizada h224G11 sobre sub-regulagem de c-Met *in vitro*

[00311] Nos exemplos que seguem, para evitar dúvida, a expressão h224G11 refere-se à forma humanizada 224G11 [TH7 Hz3] do anticorpo da invenção.

[00312] As duas linhagens de célula foram selecionadas para se dirigir à atividade de anticorpos anti-c-Met sobre a degradação do receptor c-Met. A549 (N°HTB-174) e NCI-H441 (N°CCL-185) são duas linhagens de célula NSCLC da coleção da ATCC. Células NCI-H441 foram semeadas em RPMI 1640 + L-glutamina 1% + FBS inativado com calor 10%, a 3 x 10^4 células/cm^2 em placas de seis cavidades por 24 h a 37º C em uma atmosfera de CO_2 5%. As células A549 foram semeadas em F12K + FBA inativado com calor 10% a 2x10^4 células/cm^2 em placas de seis cavidades por 24 h a 37º C em uma atmosfera de CO_2 5%.

[00313] Então, as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ante de serem deixadas em jejum em soro por mais 24 horas. Anticorpos anti-c-Met (10 µg/ml), mIgG1 irrelevante (10 µg/ml) ou HGF (400 ng/mL) foram adicionados em meio DMEM livre de soro a 37º C. Após ou 4 horas ou 24 horas de incubação, o meio foi suavemente removido e as células lavadas duas vezes com PBS gelado. As células foram lisadas com 500 µL de tampão de lise gelado [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 150 mM; Nonidet P40 1%; desoxicolato 0,5%; e 1 tablete de coquetel inibidor de protease com-

pleto mais antifosfatases 1%]. Os lisatos de célula foram agitados por 90 minutos a 4º C e limpos a 15.000 rpm por 10 minutos. Neste estágio, os lisatos de célula podiam ser armazenados a -20º C até necessário para análise Western blot. A concentração de proteína foi quantificada usando BCA. Lisatos de célula integral (5 µg em 20 µl) foram separados através de SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram saturadas por 1 h em RT com TBS-Tween 20 0,1% (TBST); leite em pó desnatado 5% e sondadas com anticorpo anti-c-Met (diluição 1/100) da noite para o dia a 4º C em TBST-leite em pó desnatado 5%. Os anticorpos foram diluídos em solução salina tamponada tris-tween 20 0,1% (v/v) (TBST) com 1% de leite em pó desnatado. Então, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:1000) por 1 h em RT. Proteínas imunorreativas foram visualizadas com ECL (Pierce N° 32209). Após visualização de c-Met, as membranas foram lavadas mais uma vez com TBST e incubadas por 1 h em RT com anticorpo anti-GAPDH de camundongo (diluição 1/200.000) em TBST-leite em pó desnatado 5%. Então, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase por 1 h em RT. As membranas foram usadas e GAPDH foi revelado usando ECL. A intensidade da faixa foi quantificada através de densitometria.

[00314] Os resultados apresentados nas figuras 19A e 20A demonstraram que ambos o m224G11 e o h224G11 são capazes de subrregular significantemente c-Met, de uma maneira dependente da dose, em ambas as linhagens de célula A549 e NCI-H441. A subrregulagem já é significante após um tempo de incubação de 4 horas e ainda aumenta em 24 horas. Os histogramas apresentados nas Figuras 19A e 20A correspondem aos valores médios ou respectivamente 4 e 3 experimentos independentes. Imagens de Western blot correspondendo a

um experimento significante foram incluídas nas figuras 19B e 20B.

Exemplo 14: Efeito de m22411 e sua forma humanizada h224G11 sobre espalhamento de c-Met *in vitro*

[00315] Formas espalhadas solúveis do receptor c-Met ocorrem naturalmente no soro de camundongos xenoenxertados com tumor humano ou em soro de paciente humano carregando tumores expressando c-Met. Além disso, anticorpos direcionados contra c-Met tal como o Mab DN30, são descritos como indutores de espalhamento de c-Met em experimentos *in vitro*. Para determinar se m224G11 tinha tal propriedade, as células foram semeadas em placas de seis cavidades em meio FCS 10%. Quando elas atingiram aproximadamente 80% de confluência, o meio foi removido e meio de cultura completo fresco +/- compostos a serem testados foram adicionados. As células foram incubadas mais 72 horas ou com m224G11, um controle de isotipo mIgG1 ou PBS. PMA (acetato de forbol miristato) foi introduzido como um indutor de espalhamento. HGF foi também testado em células para determinar o impacto de ligante de c-Met sobre espalhamento de ocorrência natural. Então os sobrenadantes foram coletados e filtrados em 0,2 µm antes do uso em um teste ELISA onde as formas solúveis de c-Met foram capturadas com um anticorpo anti-c-Met que não reconhece o mesmo epítopo que ou m224G11 ou c11E1 (figura 21). Além disso, as células de cada cavidade foram lavadas uma vez com PBS e lisadas para determinar a concentração de proteína. Para o ELISA, 224D10 foi usado como um anticorpo de captura e após saturação da placa, os sobrenadantes filtrados das seis placas foram adicionados no teste ELISA. Uma forma de c-Met monomérica foi usada como um controle positivo. Após incubação do sobrenadante, as placas foram lavadas para remover o c-Met não ligado e c11E1 foi usado para detectar o c-Met capturado pelo Mab 224G11. A revelação do teste foi finalmente realizada através da adição de um anticorpo policlonal anti-

hFc conjugado com HRP.

[00316] Os resultados mostrados na figura 22 indicam que um espalhamento natural de c-Met ocorreu quando as células foram culturadas por 72 horas *in vitro*. Nenhum efeito do mIgG1 foi observado. No entanto, a adição de m224G11 parecia inibir o espalhamento de c-Met. Esses resultados foram confirmados para 2 outras linhagens de célula (Hs746T, EBC1 e MHKN45) na Figura 23. No segundo experimento, o PMA foi adicionado como um indutor de espalhamento positivo, aumentou significantemente, conforme esperado, o espalhamento de c-Met pelo menos em 2 linhagens de célula (Hs746T e MKN45). Finalmente, em um terceiro experimento (figura 24), HGF foi introduzido como um controle. Nenhum espalhamento adicional foi induzido por HGF comparado com células sozinhas ou células + mIgG1. Novamente, uma inibição significante de espalhamento de c-Met foi observada com m224G11.

Exemplo 15: Efeito intrínseco de h224G11 Ab sobre várias linhagens de célula

[00317] Nos experimentos anteriores descritos na presente patente foi demonstrado que em contraste com o que foi observado com outros anticorpos tais como 5D5, o m224G11 e sua forma humanizada h224G11 não mostram linhagens de célula de tumor de atividade intrínseca significante. Para estender esta propriedade para outras linhagens de célula, experimentos western blot e fosfo-ELISA foram realizados com o anticorpo sozinho, adicionado várias vezes, em um conjunto de linhagens de célula de câncer, com níveis variáveis de expressão de c-Met, incluindo Hs746T, NCI-H441, Hs578T, NCI-H125, T98G, MDA-MB-231, PC3. O mesmo teste foi também realizado em uma célula normal: HUVEC.

[00318] Método para o ensaio ELISA de fosfo-c-Met já foi descrito no Exemplo 5 do presente pedido de patente. Para a análise Western,

lisatos de proteína foram feitos de células peletizadas através de incubação em tampão de lise com inibidores de proteases e fosfatase [10 nM Tris (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Nonidet P40 0,5%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, PMSF 2 mM, leupeptina 10 mg/ml, aprotinina 10 mg/ml] a 4º C. Os lisatos de proteína foram limpos de restos celulares através de centrifugação, dissolvidos através de eletroforese em géis SDS-PAGE 8% e eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose. Para experimentos de c-Met, os lisatos foram imunoprecipitados para proteína específica de interesse antes da eletroforese e transferência.

[00319] Os resultados apresentados nas figuras 25 a 32 demonstram novamente que nenhuma atividade intrínseca do anticorpo h224G11 foi observada nas células testadas.

Exemplo 16: Comparação *in vivo* do 224G11 do tipo selvagem de murino com uma forma 224G11 com dobra engenheirada quimérica descrita como 224G11[C2D5-7] (modelo de xenoenxerto NCI-H441)

[00320] NCI-H441 é derivado de adenocarcinoma de pulmão papilar, expressa níveis altos de c-Met e demonstra fosforilação constitutiva de RTK de c-Met.

[00321] Para avaliar a necessidade de engenharia de dobra para proteger a atividade *in vivo* do anticorpo de murino 224G11, camundongos atímicos de seis a oito semanas de vida foram alojados em gaiolas com filtro em cima esterilizadas, mantidos em condições estéreis e manipulados de acordo com as orientações Francesa e Europeias. Os camundongos foram injetados subcutaneamente com $9x10^6$ células NCI-H441. Então, seis dias após o implante, os tumores eram mensuráveis (aproximadamente 100 mm^3), os animais foram divididos em grupos de 6 camundongos com tamanho de tumor comparável e tratados primeiro com uma dose de carga de 2 mg de anticorpo/camun-

dongo e então duas vezes por semana com 1 mg/dose de cada anticorpo a ser testado. Os camundongos seguiram para a observação de taxa de crescimento de xenoenxertos. O volume do tumor foi calculado através da fórmula: π (Pi)/6 X comprimento X largura X altura. Os resultados descritos na Figura 33 demonstram que o Mab de murino destituído de qualquer atividade agonista *in vitro* se comportou, conforme esperado, como um antagonista *in vivo* potente. Conforme sugerido pelos resultados obtidos *in vitro*, em ensaios de fosforilação, o anticorpo com dobra engenheirada c224G11[C2D5-7], que não mostrou um efeito agonista significante, demonstra uma atividade *in vivo* forte, comparável com um do m224G1 no modelo de xenoenxertos NCI-H441.

Exemplo 17: Avaliação de h224G1 em um teste de ADCC

[00322] Como h224G11 é do isotipo IgG1, ADCC poderia ser parte de sua eficácia *in vivo* em humano. Um ensaio de citotoxidez de liberação de [^{51}Cr] *in vitro* foi realizado usando células ou Hs746T ou NCI-H441como células alvo e células NK purificadas de linfócitos mononucleares de sangue periférico humano.

[00323] Em suma, um milhão de células alvo Hs746T ou NCI-H441 foi incubado com ou sem 20 µg de h224G11 Ab na presença de 100 µCi de ^{51}Cromo (Perkin Elmer) por 1 h. Então, 4 x 10^3 células foram plaqueadas com um número grande de células assassinas naturais humanas (NK) isoladas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) usando uma seleção negativa (Stemcell Technologies). As células foram incubadas juntas por mais 4 horas a 37º C. A porcentagem de lise de célula foi calculada seguindo a fórmula: [(liberação de ^{51}Cr experimental – liberação de ^{51}Cr espontânea)/(liberação de ^{51}Cr total – liberação de ^{51}Cr espontânea)] x 100. A liberação espontânea representa as contagens obtidas quando as células alvo foram culturadas na ausência de células assassinas naturais. Liberação total representa as contagens obtidas quando as células alvo foram lisadas com Triton X-100

1%. H224G11 aumentou significantemente a lise de ambas as células Hs746T (figura 34A) e NCI-H441 (figura 34b) em 62,9% e 63,2%, respectivamente, em uma razão de células NK/alvo de 100.

Exemplo 18: Estudos Imunoistoquímicos (IHC)

[00324] Procedimentos de Tingimento com IHC de Tumores Embebidos em Parafina: seções de 8 a 12 µM de tumor congelado foram _ e imediatamente fixadas em acetona pré-esfriada -20º C por 3 minutos. As lâminas foram então esfriadas em temperatura ambiente por 30 minutos a 1 hora. Após 2 lavagens em PBS, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada usando Reagente de Bloqueio de Peroxidase (Dako K4007) por cinco minutos. As seções foram lavadas com PBS e incubadas em reagente de bloqueio de avidina/biotina (Dako X0590) um pouco antes da saturação dos sítios não específicos em PBS-BSA 4% por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, as lâminas foram incubadas com o h224G11 biotinilado (50 a 10 µg/ml) ou IgG1/kappa biotinilado humano (50 a 10 µg/ml, o Sítio de Ligação) como controle negativo 2 horas em temperatura ambiente.

[00325] As seções foram lavadas com PBS e incubadas com complexo de Estreptavidina-peroxidase universal (Dako K0679) por 30 a 45 minutos. 3-Amino-9-etilcarbazol foi usado para desenvolvimento de um produto de reação vermelho (Sigma). As lâminas foram imersas em hematoxilina por 4 minutos para contratingimento (Dako S3309).

[00326] Os resultados são apresentados na figura 35.

[00327] H224G11 tinge diferencialmente a membrana celular de vários tipos de tumor. Neste procedimento de imunoistoquímica, o produto de reação vermelho se relaciona com tingimento positivo da membrana celular e falta de produção de reação vermelha se relaciona com tingimento negativo e nenhuma visualização da membrana celular. O controle de IgG, IgG1 humano/kappa é um controle compatível com isotipo.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, capaz de inibir a dimerização de c-Met, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s. 1, 2 e 3; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 com respectivamente as sequências de aminoácido SEQ ID N°s. 5, 6 e 7, ainda pelo fato de que:

(i) o referido anticorpo ou um fragmento funcional divalente do mesmo compreende também uma região de dobra compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 28, e

(ii) o referido anticorpo ou um fragmento funcional divalente do mesmo é acoplado quimicamente a um agente citotóxico.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, caracterizado pelo fato de que consiste em um anticorpo humanizado.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio variável de cadeia pesada de sequência compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°:4 e um domínio variável de cadeia leve de sequência compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 10.

4. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo compreende uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N°: 37 e uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID N° 40.

5. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, caracteri-

zado pelo fato de que o referido agente citotóxico é selecionado dentre agentes alquilantes, anti-metabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores mitóticos, inibidores da função cromatina, agentes antiangiogênese, agentes anti-estrogênicos, agentes anti-androgênicos, imunomoduladores ou inibidores de quinase.

6. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, caracterizado pelo fato de que o referido agente citotóxico é um inibidor mitótico .

7. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende por meio de princípio ativo um composto consistindo em um anticorpo, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Uso de um anticorpo, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou de uma composição, como definida na reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento pretendido inibir o crescimento e/ou a proliferação de células de tumor.

9. Uso de um anticorpo, ou um fragmento funcional divalente do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou de uma composição, como definida na reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento pretendido para a prevenção ou para o tratamento de câncer.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o referido câncer é um câncer escolhido dentre câncer de próstata, osteossarcomas, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer endometrial, glioblastoma ou câncer de colo.

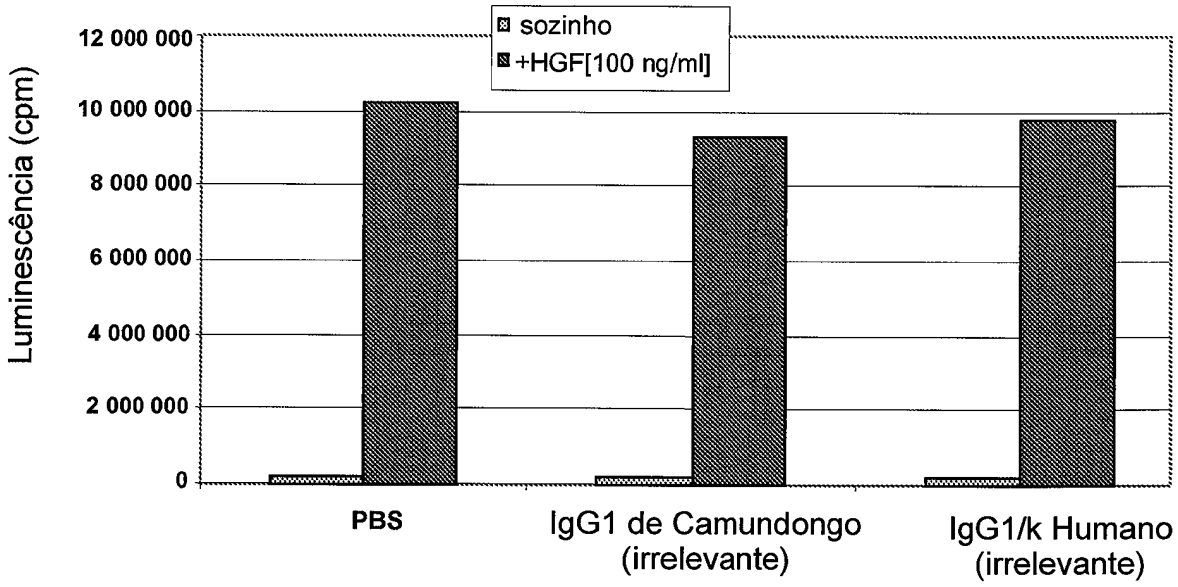

sozinho
+HGF[100 ng/ml]
Luminescência (cpm)
12 000 000
10 000 000
8 000 000
6 000 000
4 000 000
2 000 000
0
PBS
IgG1 de Camundongo (irrelevante)
IgG1/k Humano (irrelevante)

FIG. 1

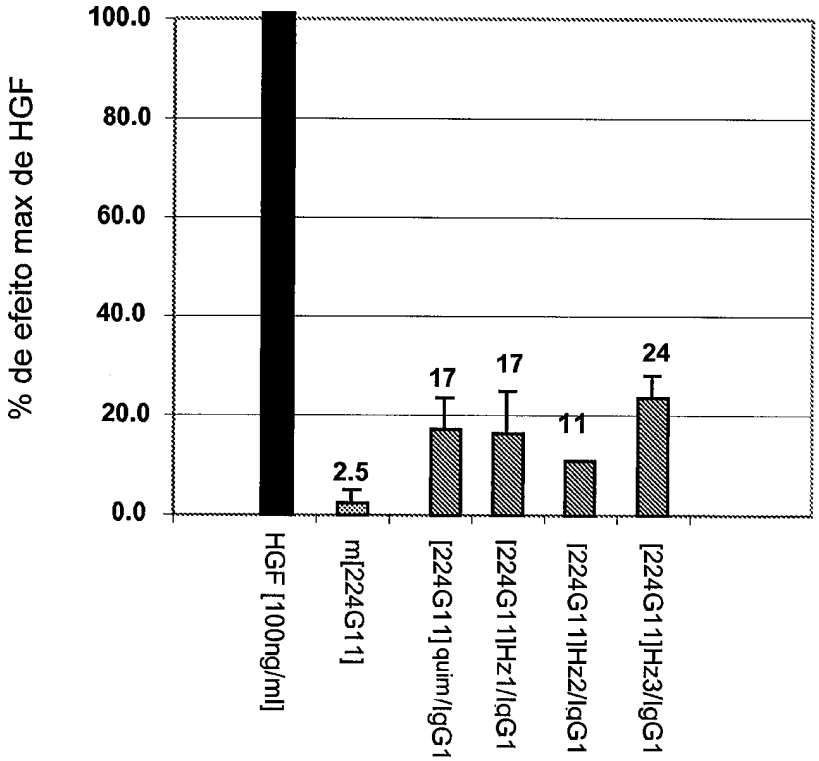

% de efeito max de HGF
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
2.5
17
17
11
24
HGF [100ng/ml]
m[224G11]
[224G11]quim/IgG1
[224G11]Hz1/IgG1
[224G11]Hz2/IgG1
[224G11]Hz3/IgG1

FIG. 2A

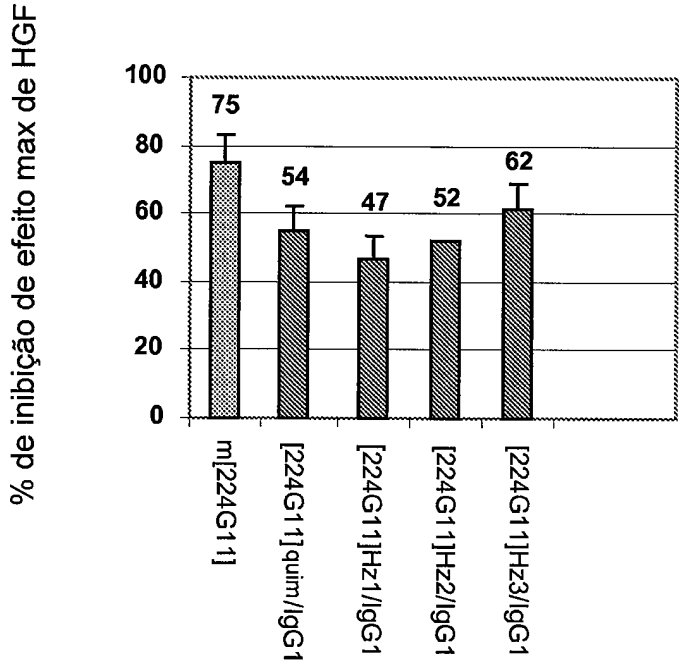

% de inibição de efeito max de HGF
100
80
60
40
20
0
75
54
47
52
62
m[224G11]
[224G11]quim/IgG1
[224G11]Hz1/IgG1
[224G11]Hz2/IgG1
[224G11]Hz3/IgG1

FIG. 2B

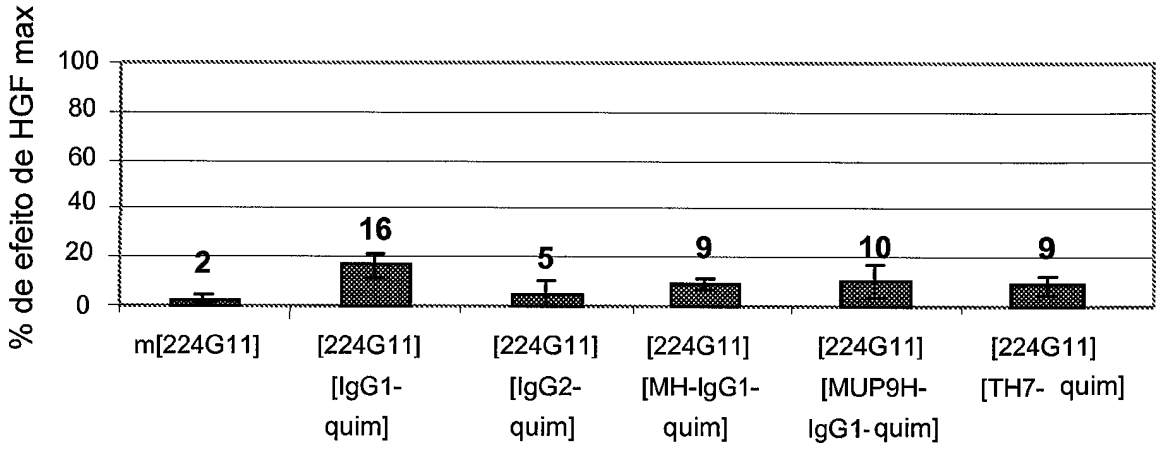

% de efeito de HGF max
100
80
60
40
20
0
2
16
5
9
10
9
m[224G11]
[224G11] [IgG1-quim]
[224G11] [IgG2-quim]
[224G11] [MH-IgG1-quim]
[224G11] [MUP9H-IgG1-quim]
[224G11] [TH7- quim]

FIG. 3A

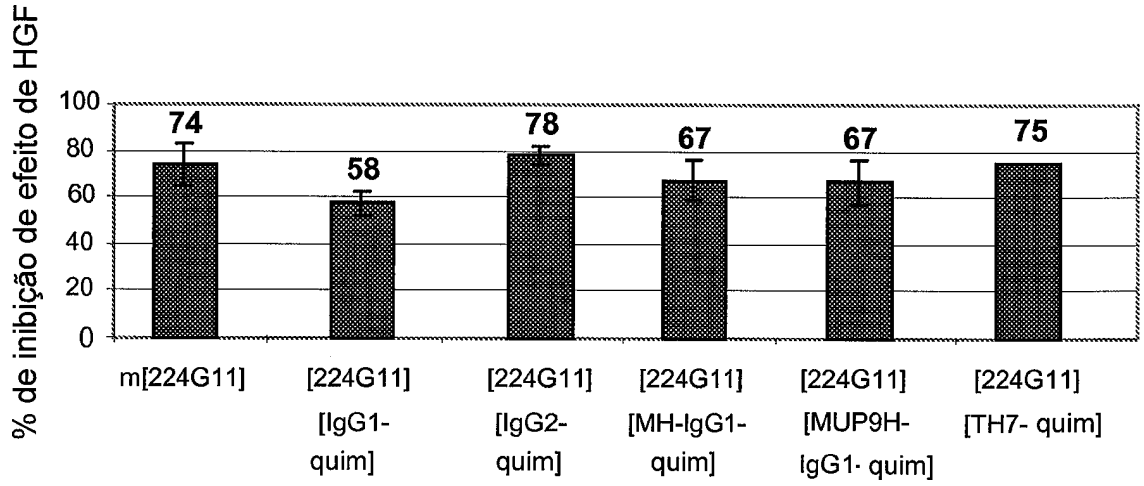

% de inibição de efeito de HGF
100
80
60
40
20
0
74
58
78
67
67
75
m[224G11]
[224G11] [IgG1-quim]
[224G11] [IgG2-quim]
[224G11] [MH-IgG1-quim]
[224G11] [MUP9H-IgG1- quim]
[224G11] [TH7- quim]

FIG. 3B

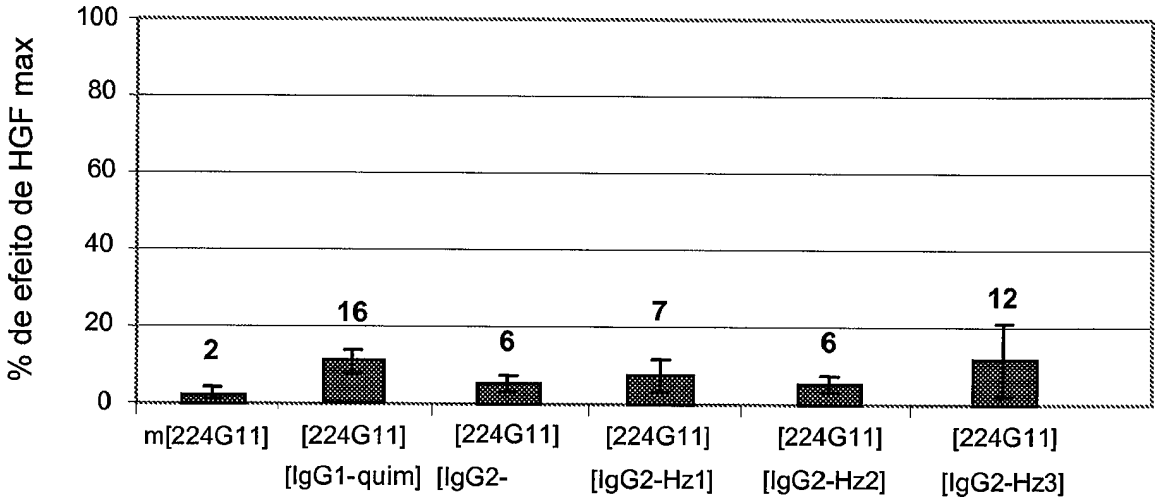

% de efeito de HGF max
100
80
60
40
20
0
2
16
6
7
6
12
m[224G11]
[224G11] [IgG1-quim]
[224G11] [IgG2-
[224G11] [IgG2-Hz1]
[224G11] [IgG2-Hz2]
[224G11] [IgG2-Hz3]

FIG. 4A

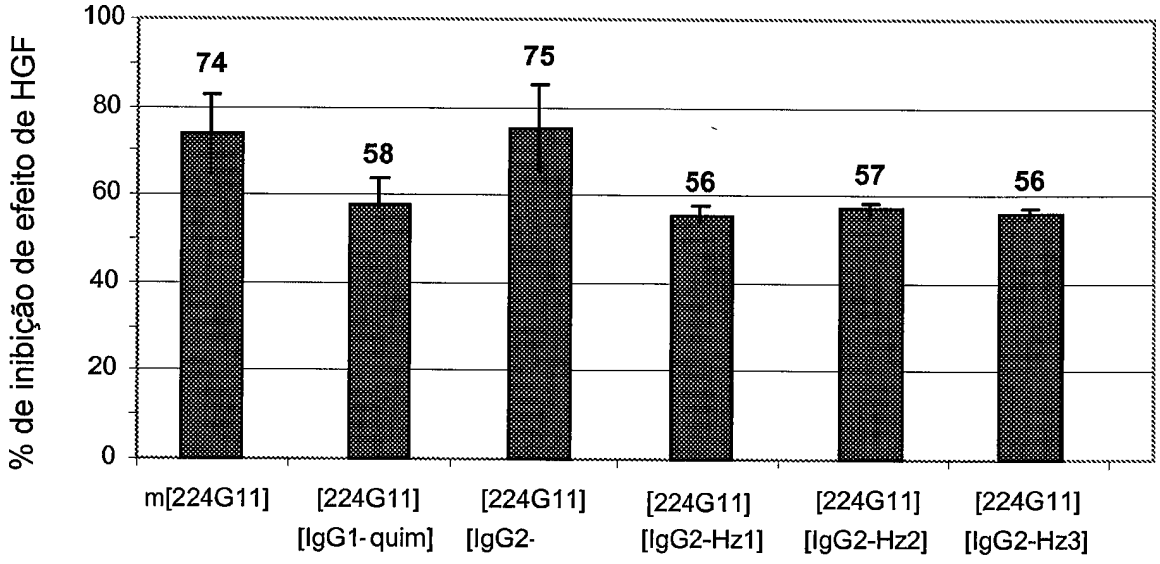

% de inibição de efeito de HGF
100
80
60
40
20
0
74
58
75
56
57
56
m[224G11]
[224G11] [IgG1-quim]
[224G11] [IgG2-
[224G11] [IgG2-Hz1]
[224G11] [IgG2-Hz2]
[224G11] [IgG2-Hz3]

FIG. 4B

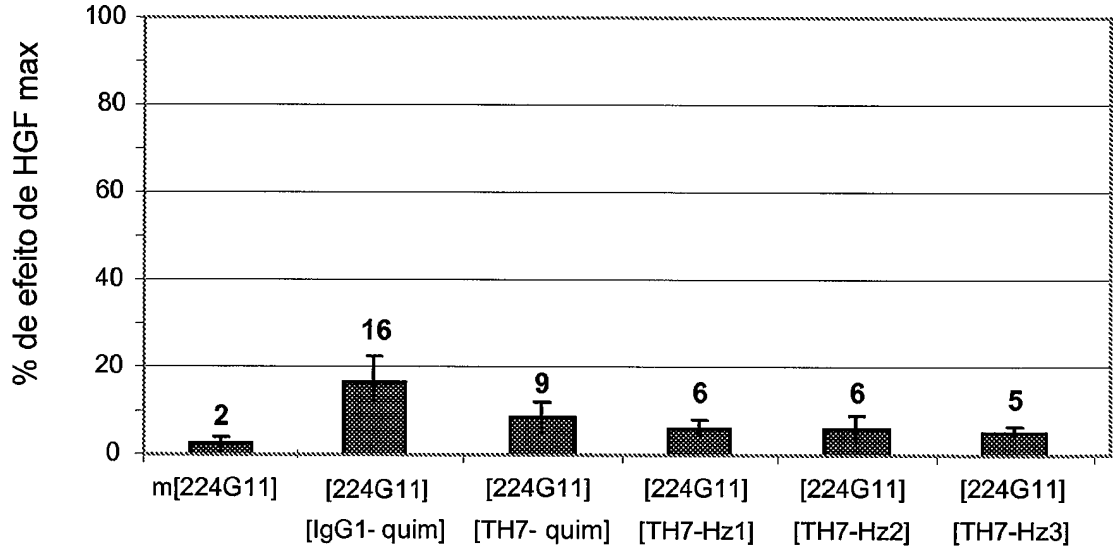

% de efeito de HGF max
100
80
60
40
20
0
2
16
9
6
6
5
m[224G11]
[224G11] [IgG1- quim]
[224G11] [TH7- quim]
[224G11] [TH7-Hz1]
[224G11] [TH7-Hz2]
[224G11] [TH7-Hz3]

FIG. 5A

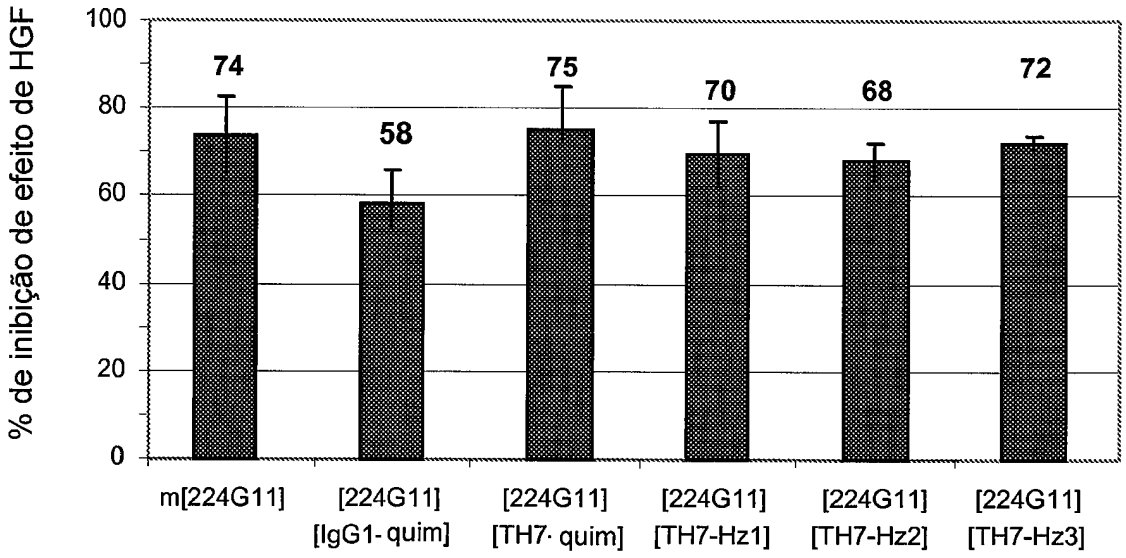

% de inibição de efeito de HGF
100
80
60
40
20
0
74
58
75
70
68
72
m[224G11]
[224G11] [IgG1- quim]
[224G11] [TH7- quim]
[224G11] [TH7-Hz1]
[224G11] [TH7-Hz2]
[224G11] [TH7-Hz3]

FIG. 5B

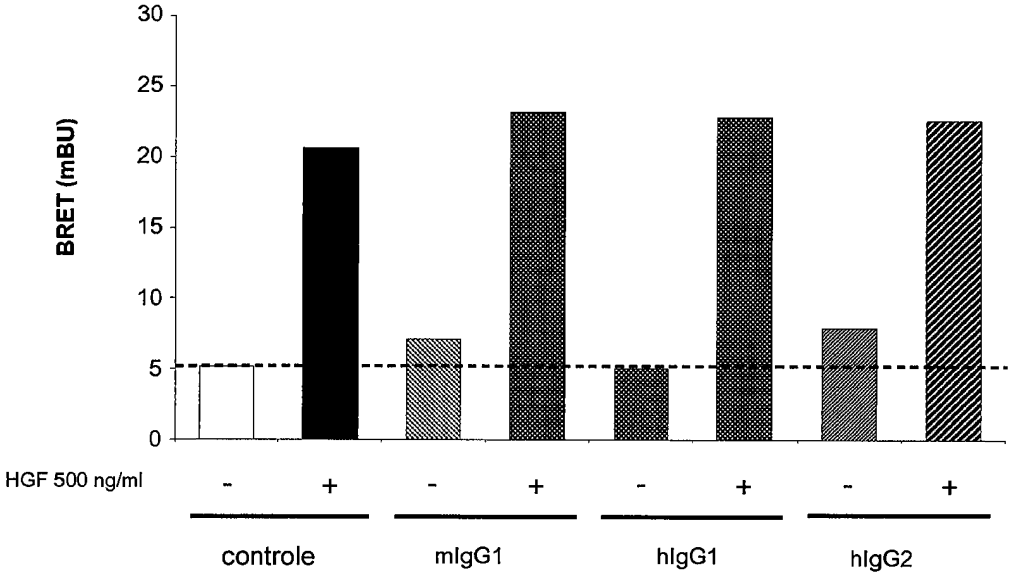

30
25
20
15
10
5
0
BRET (mBU)
HGF 500 ng/ml
- + - + - + - +
controle
mIgG1
hIgG1
hIgG2

FIG. 6A

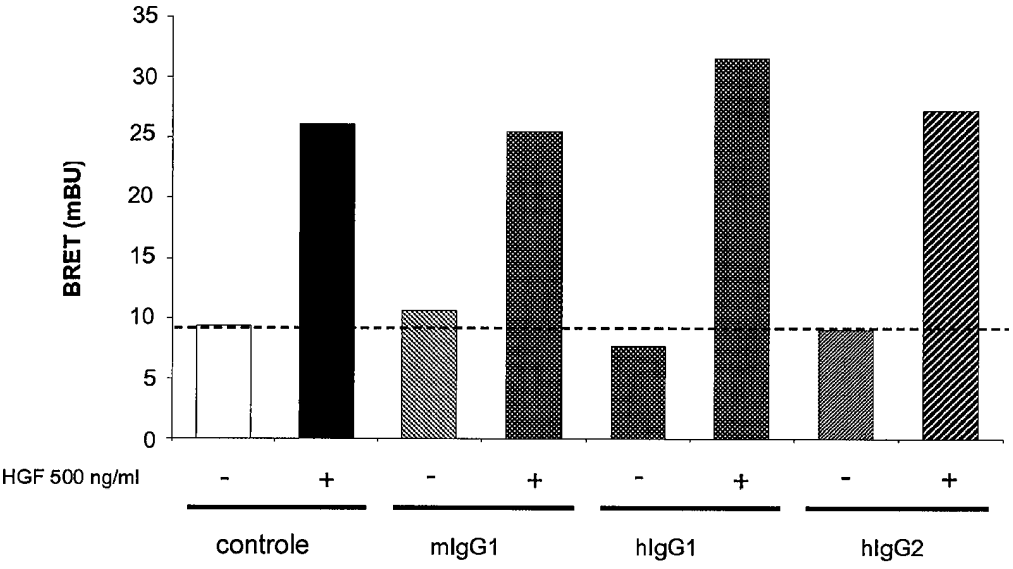

35
30
25
20
15
10
5
0
BRET (mBU)
HGF 500 ng/ml
- + - + - + - +
controle
mIgG1
hIgG1
hIgG2

FIG. 6B

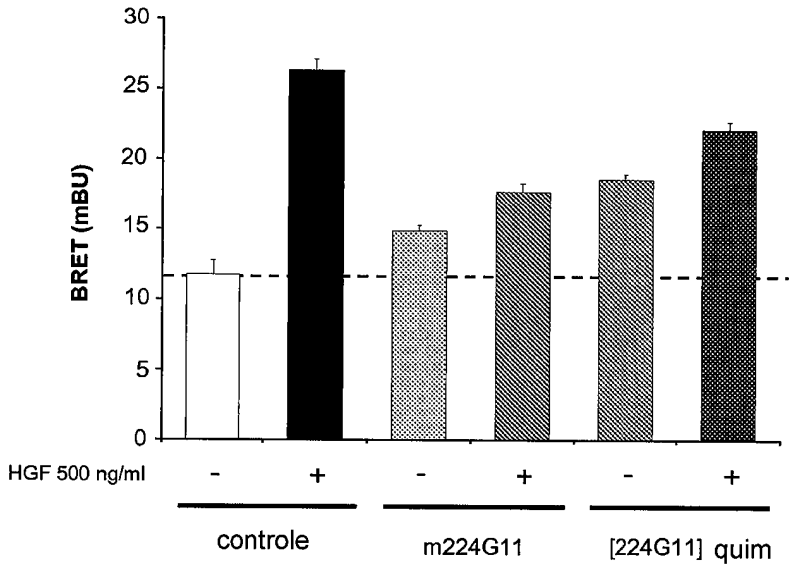

30
25
20
15
10
5
0
BRET (mBU)
HGF 500 ng/ml
-
+
-
+
-
+
controle
m224G11
[224G11] quim

FIG. 7A

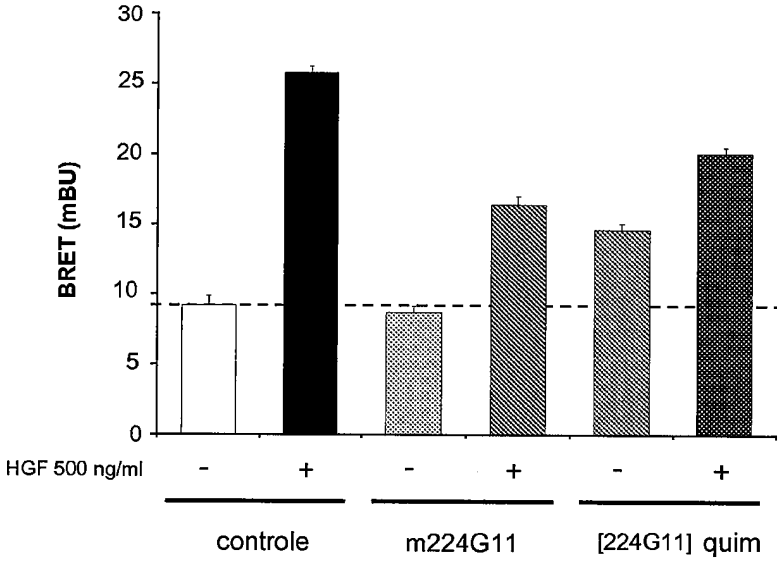

30
25
20
15
10
5
0
BRET (mBU)
HGF 500 ng/ml
-
+
-
+
-
+
controle
m224G11
[224G11] quim

FIG. 7B

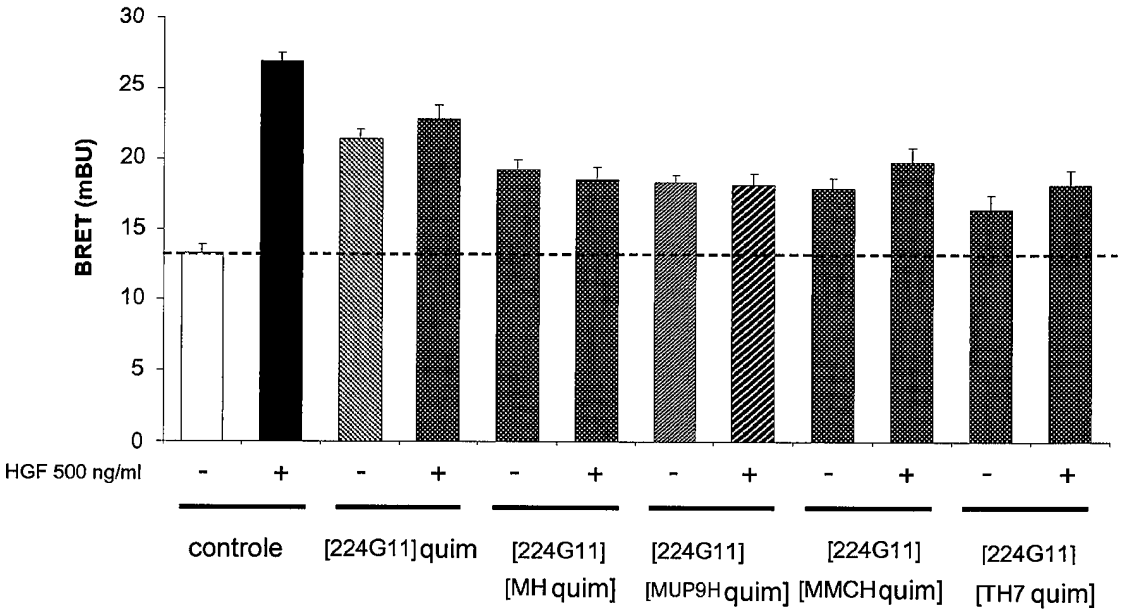

BRET (mBU)
30
25
20
15
10
5
0
HGF 500 ng/ml
- + - + - + - + - + - +
controle
[224G11]quim
[224G11] [MH quim]
[224G11] [MUP9H quim]
[224G11] [MMCH quim]
[224G11] [TH7 quim]

FIG. 8A

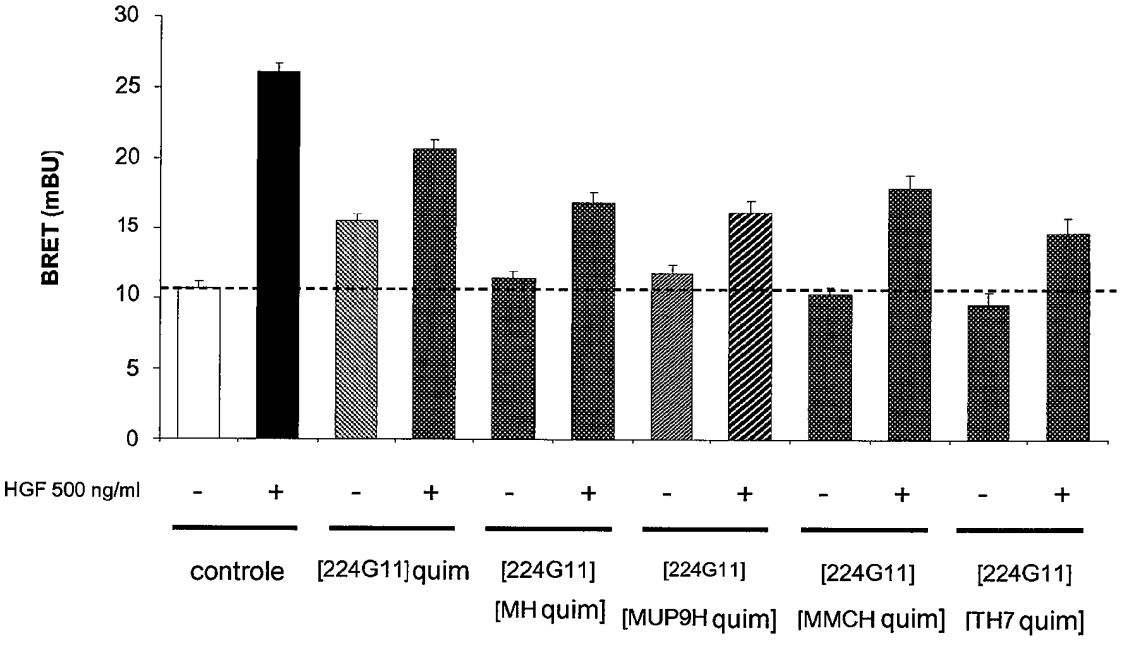

BRET (mBU)
30
25
20
15
10
5
0
HGF 500 ng/ml
- + - + - + - + - + - +
controle
[224G11]quim
[224G11] [MH quim]
[224G11] [MUP9H quim]
[224G11] [MMCH quim]
[224G11] [TH7 quim]

FIG. 8B

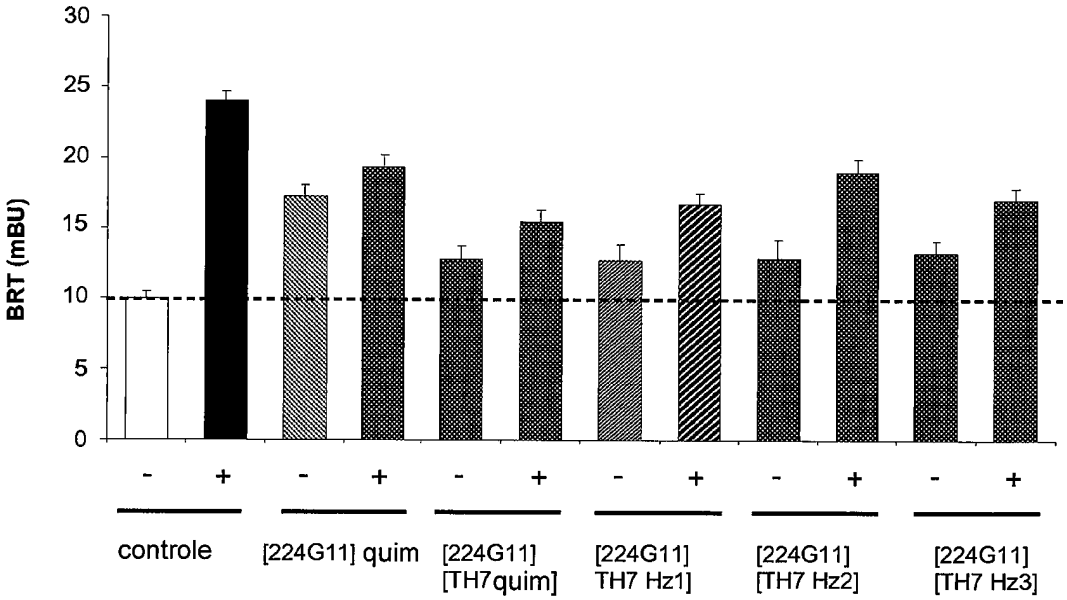

BRT (mBU)
30
25
20
15
10
5
0
- + - + - + - + - + - +
controle
[224G11] quim
[224G11] [TH7quim]
[224G11] TH7 Hz1]
[224G11] [TH7 Hz2]
[224G11] [TH7 Hz3]

FIG. 9A

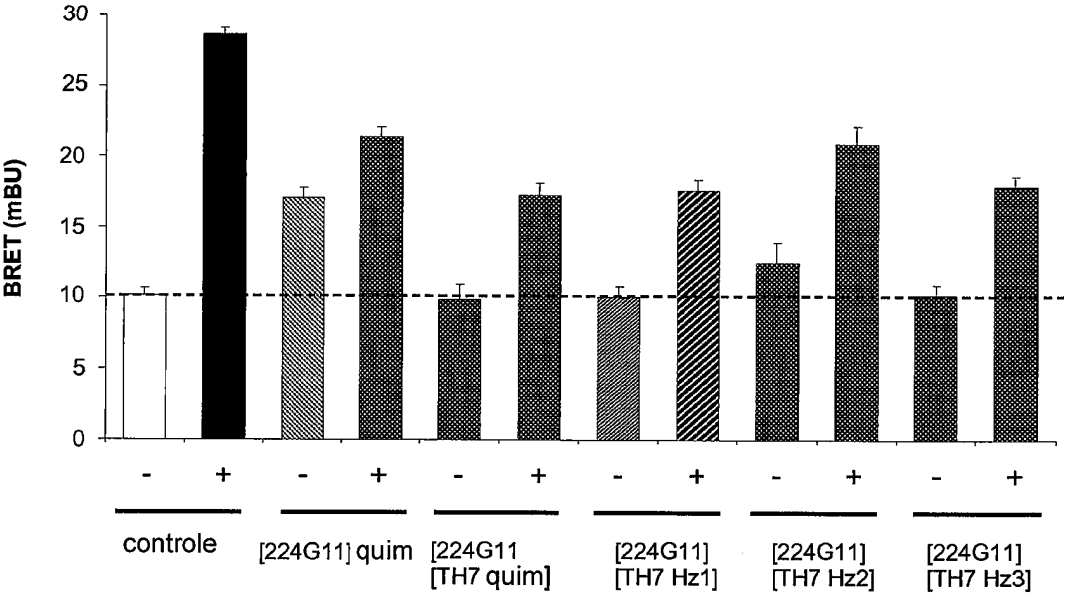

BRET (mBU)
30
25
20
15
10
5
0
- + - + - + - + - + - +
controle
[224G11] quim
[224G11 [TH7 quim]
[224G11] [TH7 Hz1]
[224G11] [TH7 Hz2]
[224G11] [TH7 Hz3]

FIG. 9B

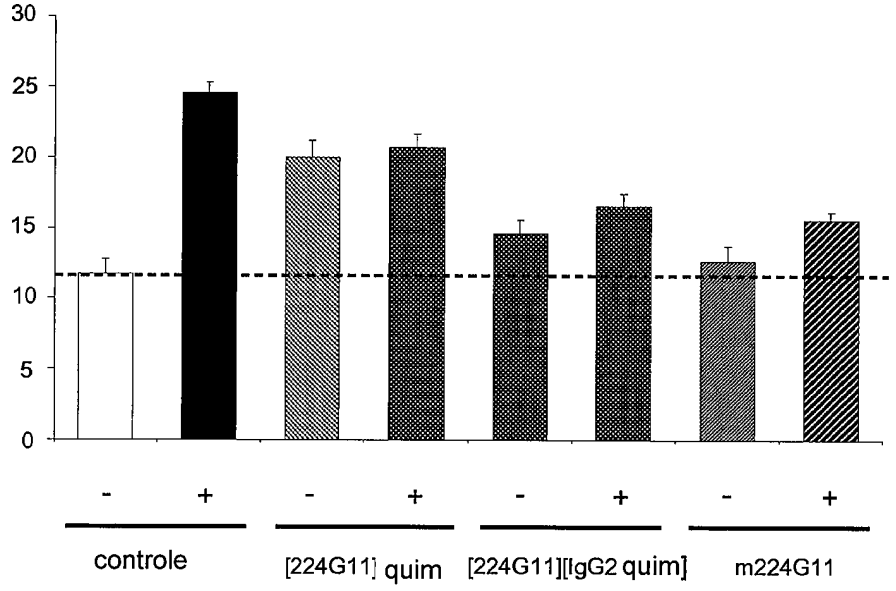


FIG. 10A

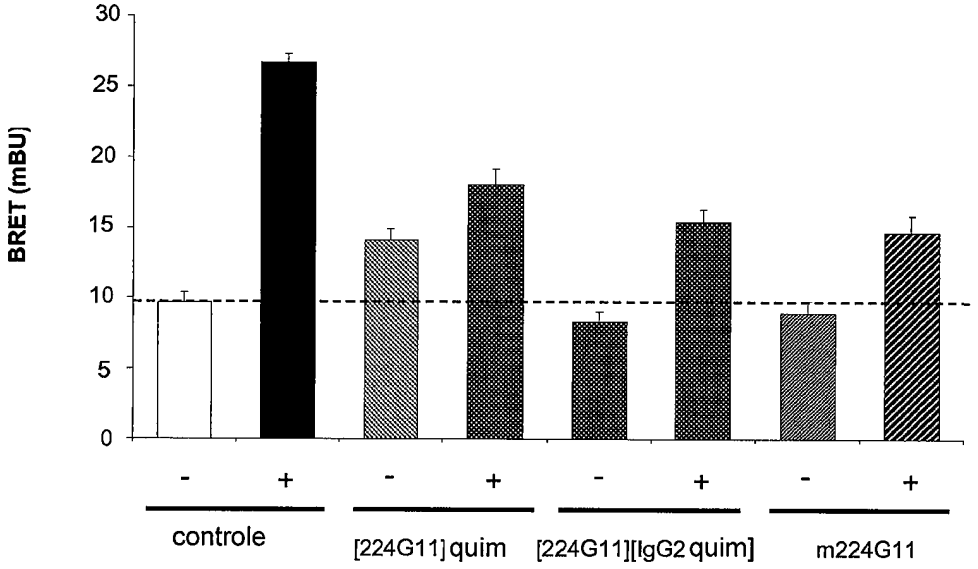
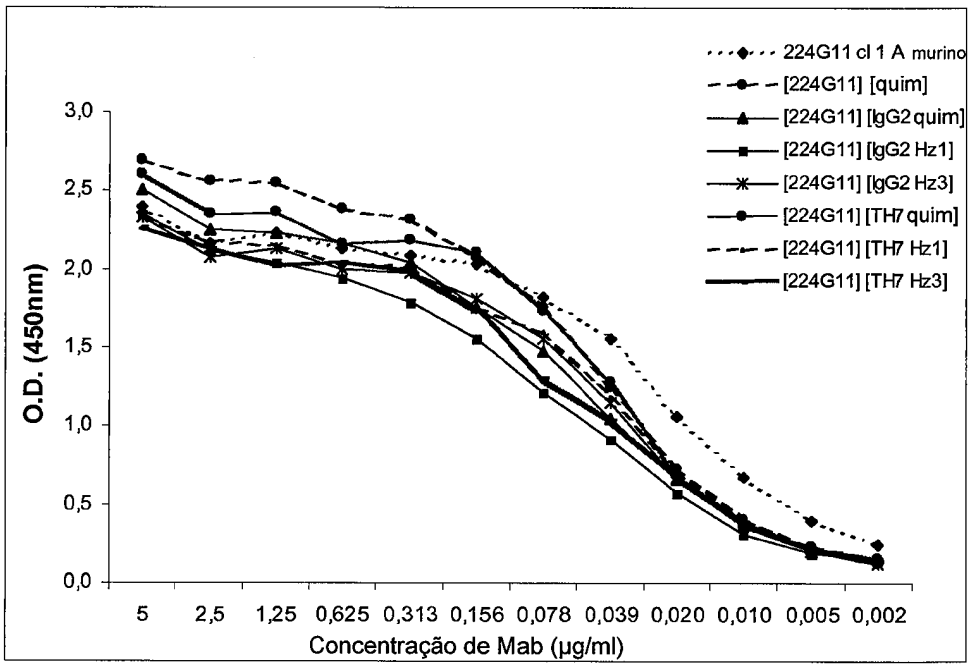


FIG. 10B


224G11 cl 1 A murino
[224G11] [quim]
[224G11] [IgG2 quim]
[224G11] [IgG2 Hz1]
[224G11] [IgG2 Hz3]
[224G11] [TH7 quim]
[224G11] [TH7 Hz1]
[224G11] [TH7 Hz3]
O.D. (450nm)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
5 2,5 1,25 0,625 0,313 0,156 0,078 0,039 0,020 0,010 0,005 0,002
Concentração de Mab (µg/ml)

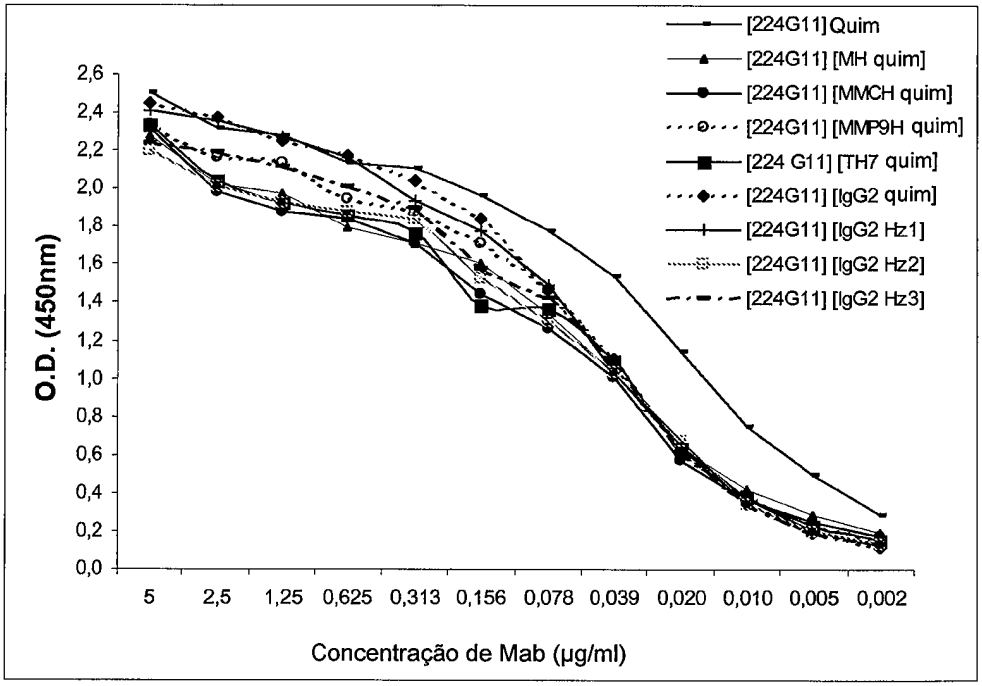

[224G11] Quim
[224G11] [MH quim]
[224G11] [MMCH quim]
[224G11] [MMP9H quim]
[224 G11] [TH7 quim]
[224G11] [IgG2 quim]
[224G11] [IgG2 Hz1]
[224G11] [IgG2 Hz2]
[224G11] [IgG2 Hz3]
O.D. (450nm)
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
5 2,5 1,25 0,625 0,313 0,156 0,078 0,039 0,020 0,010 0,005 0,002
Concentração de Mab (µg/ml)

FIG. 11

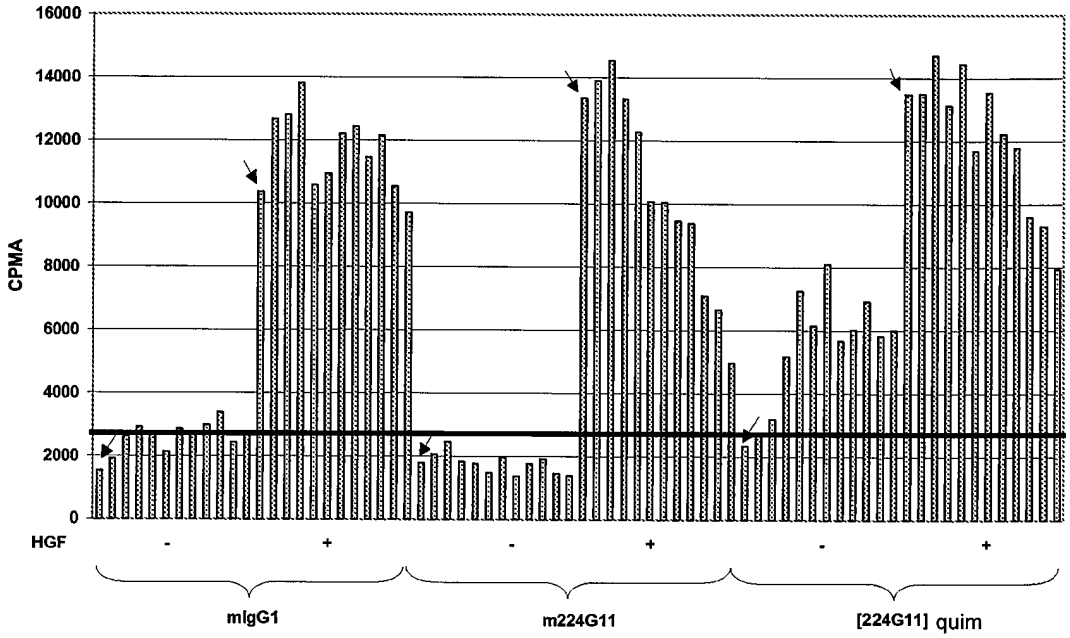

16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CPMA
HGF
-
+
-
+
-
+
mIgG1
m224G11
[224G11] quim

FIG. 12

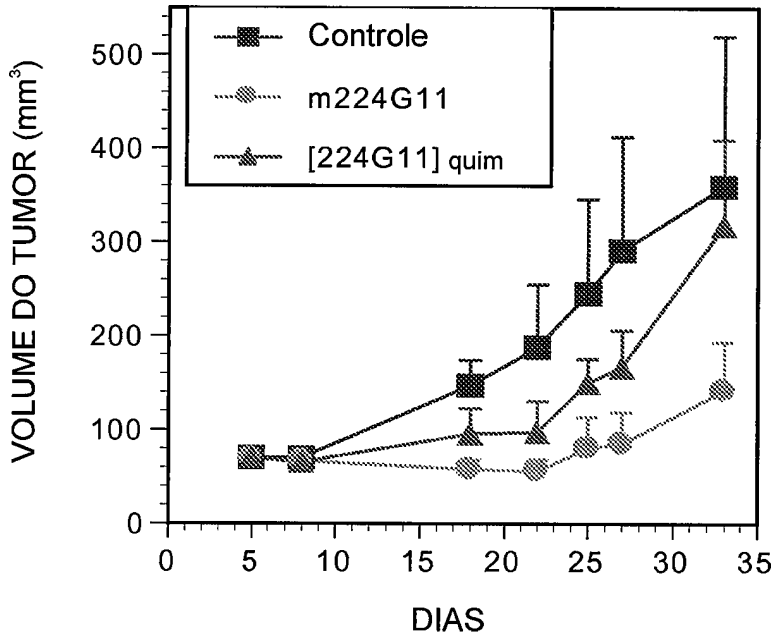

Controle
m224G11
[224G11] quim
VOLUME DO TUMOR (mm3)
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
DIAS

FIG. 13

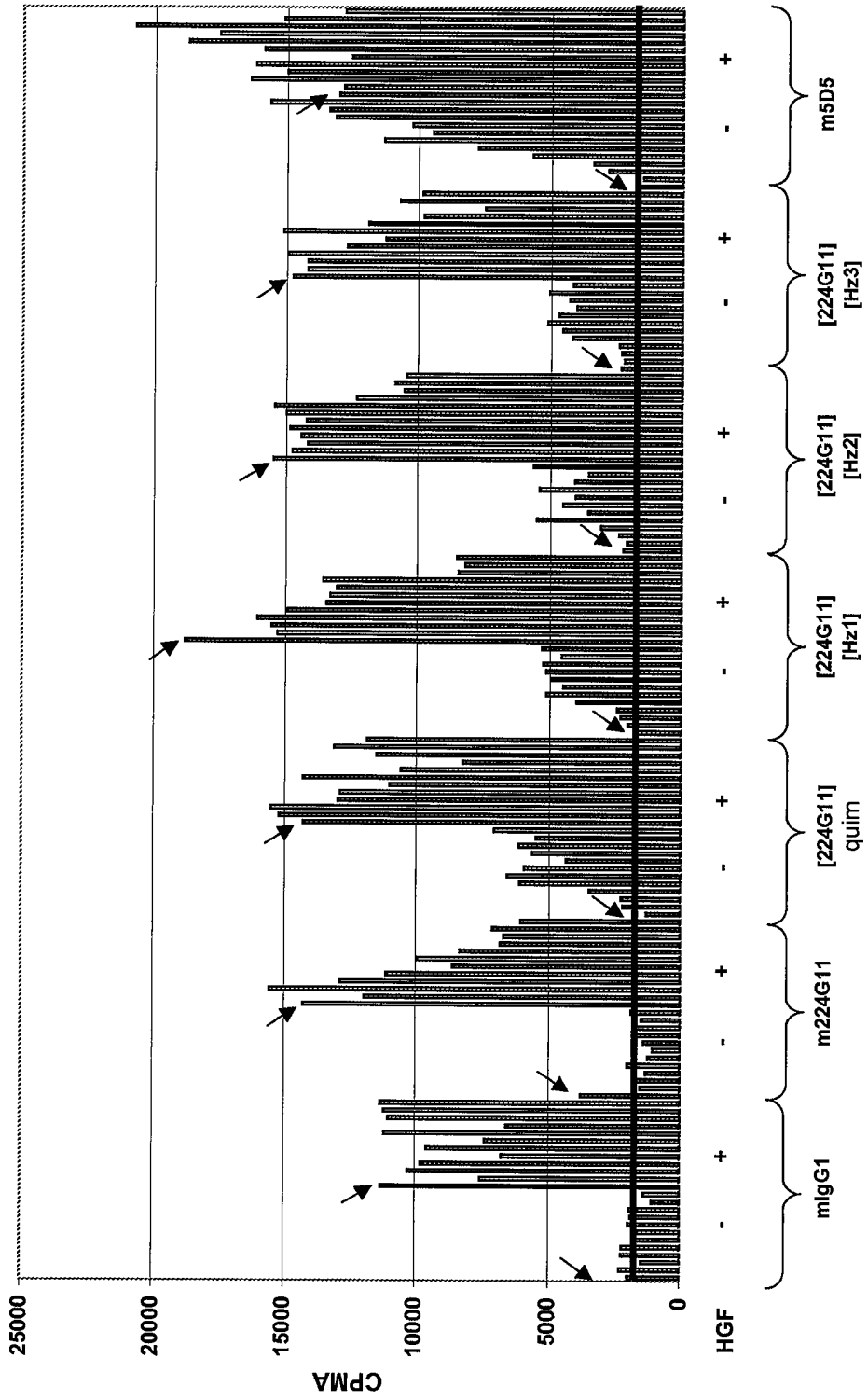

25000
20000
15000
10000
5000
0
CPMA
HGF
- + - + - + - + - +
mIgG1
m224G11
[224G11] quim
[224G11] [Hz1]
[224G11] [Hz2]
[224G11] [Hz3]
m5D5

FIG. 14A

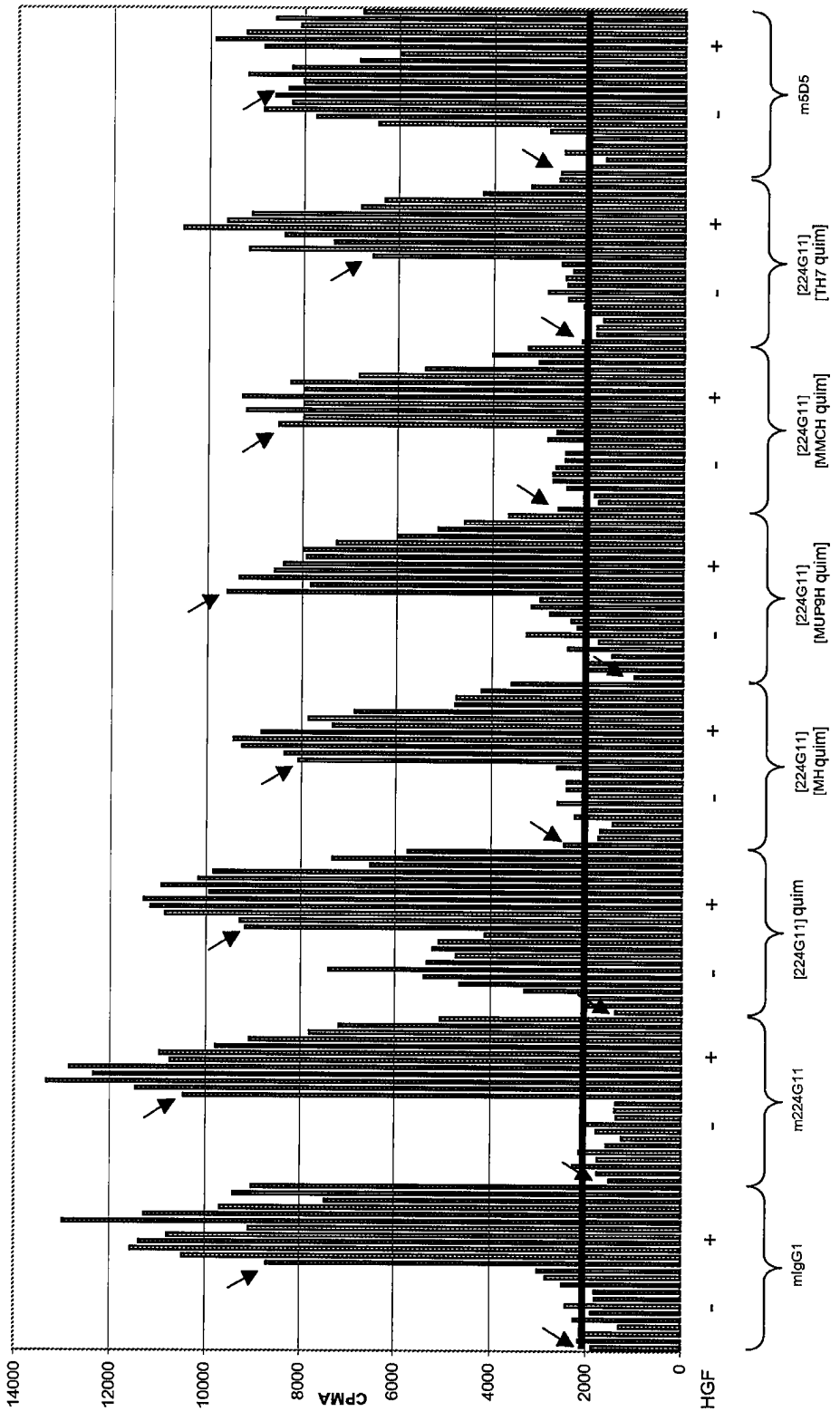

14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CPMA
HGF
- + - + - + - + - + - +
mIgG1
m224G11
[224G11] quim
[224G11] [MH quim]
[224G11] [MUP9H quim]
[224G11] [MMCH quim]
[224G11] [TH7 quim]
m5D5

FIG. 14B

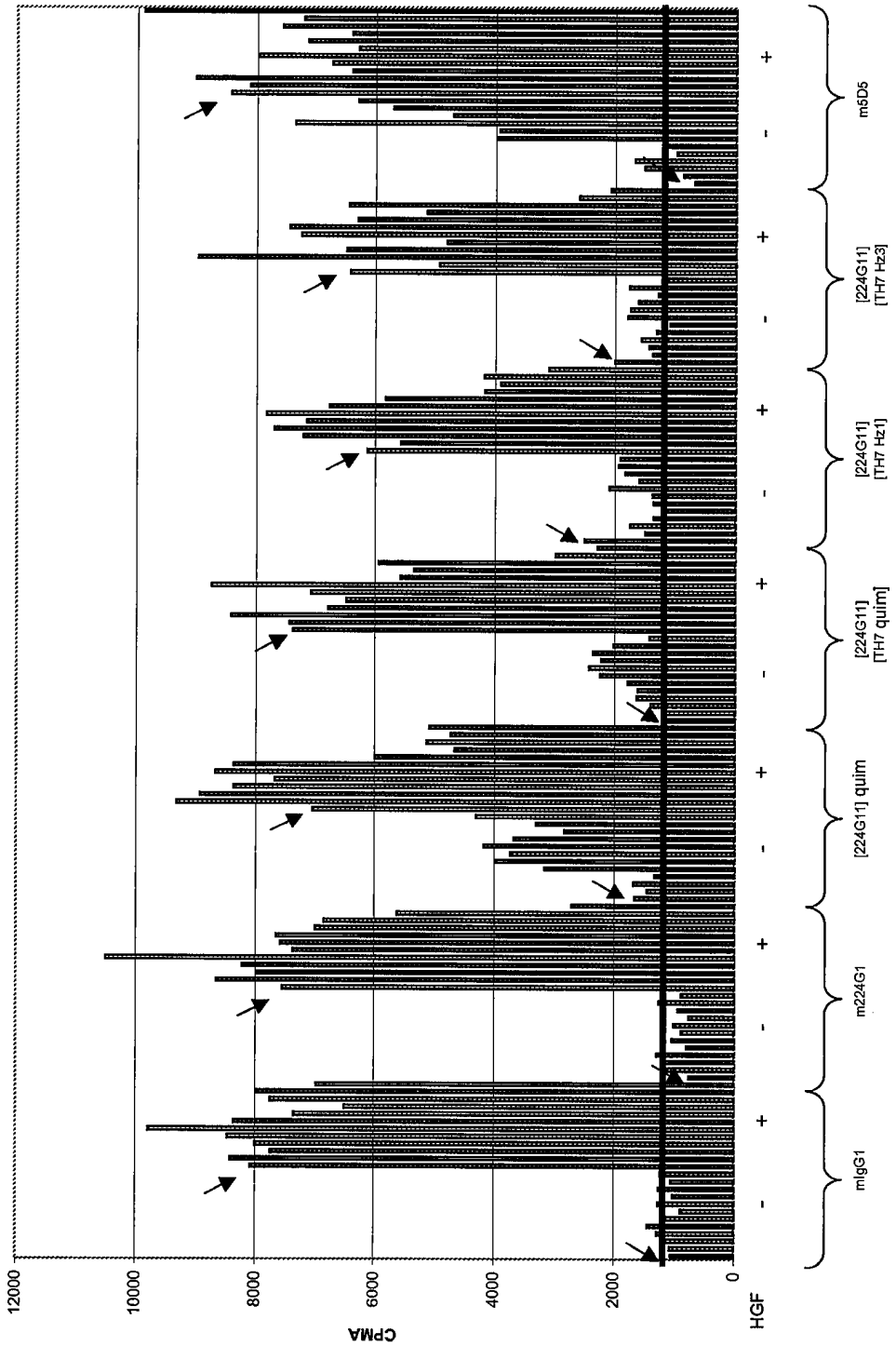

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CPMA
HGF
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
-
+
mIgG1
m224G1
[224G11] quim
[224G11] [TH7 quim]
[224G11] [TH7 Hz1]
[224G11] [TH7 Hz3]
m5D5

FIG. 15

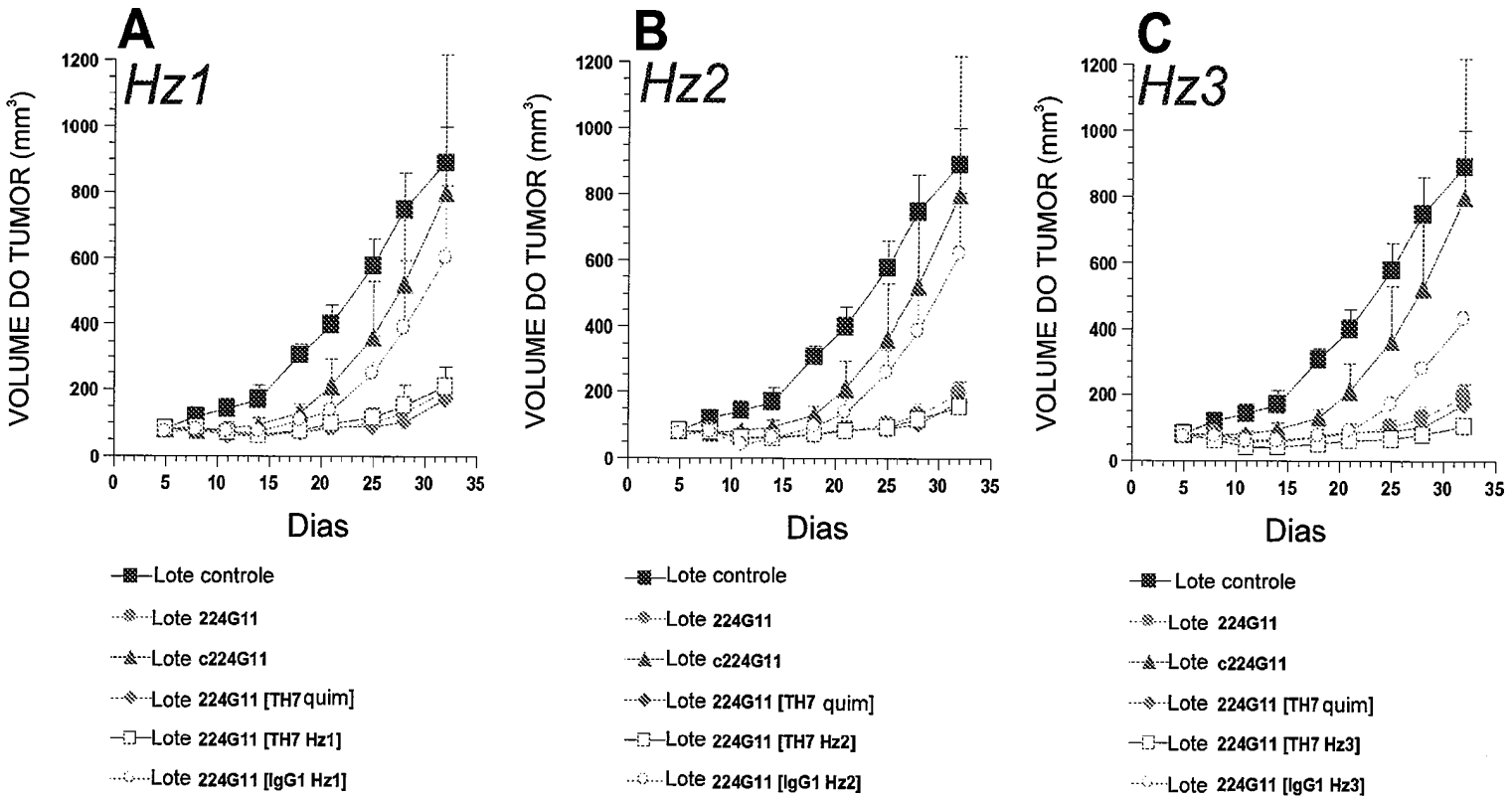

A
Hz1
B
Hz2
C
Hz3
VOLUME DO TUMOR (mm3)
Dias
0
200
400
600
800
1000
1200
0
5
10
15
20
25
30
35
Lote controle
Lote 224G11
Lote c224G11
Lote 224G11 [TH7 quim]
Lote 224G11 [TH7 Hz1]
Lote 224G11 [IgG1 Hz1]
Lote 224G11 [TH7 Hz2]
Lote 224G11 [IgG1 Hz2]
Lote 224G11 [TH7 Hz3]
Lote 224G11 [IgG1 Hz3]

FIG. 16

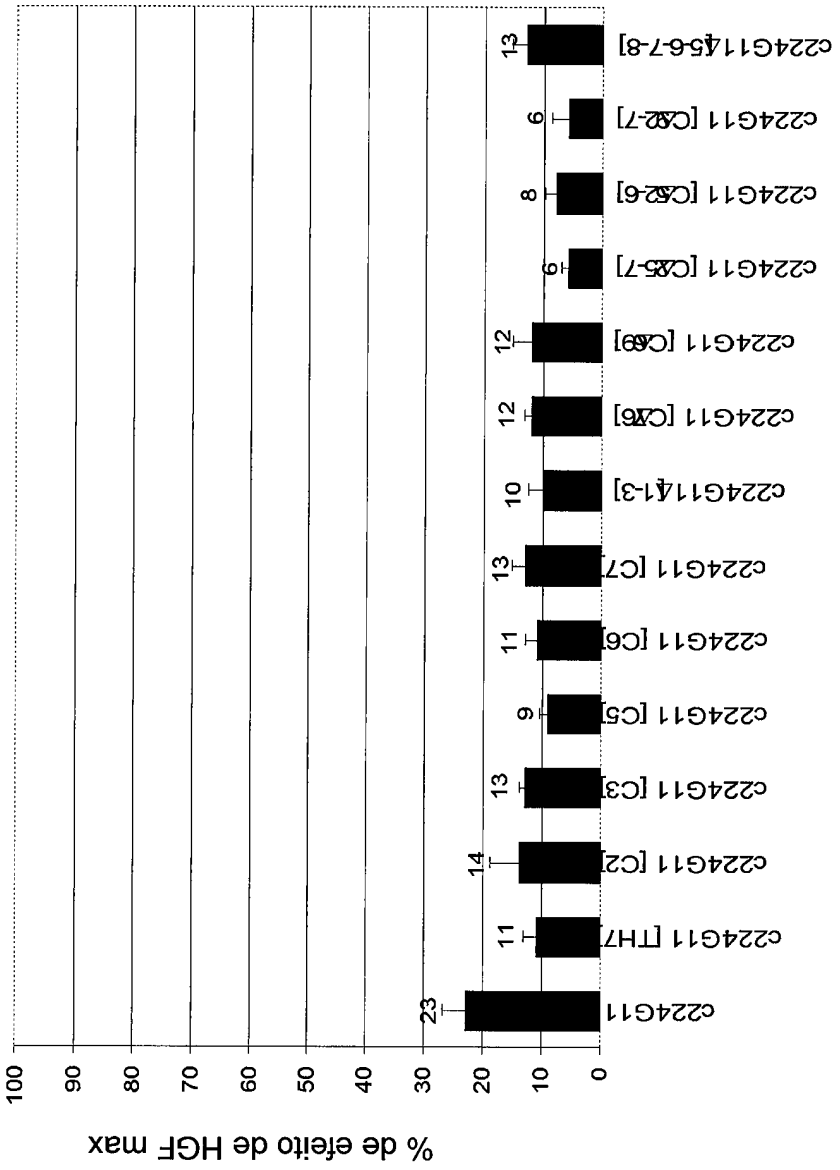

% de efeito de HGF max
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
c224G11
23
c224G11 [TH7]
11
c224G11 [C2]
14
c224G11 [C3]
13
c224G11 [C5]
6
c224G11 [C6]
11
c224G11 [C7]
13
c224G11[1-3]
10
c224G11 [C
12
c224G11 [C
12
c224G11 [C
9
c224G11 [C
8
c224G11 [C
6
c224G11[5-6-7-8]
13

FIG. 17A

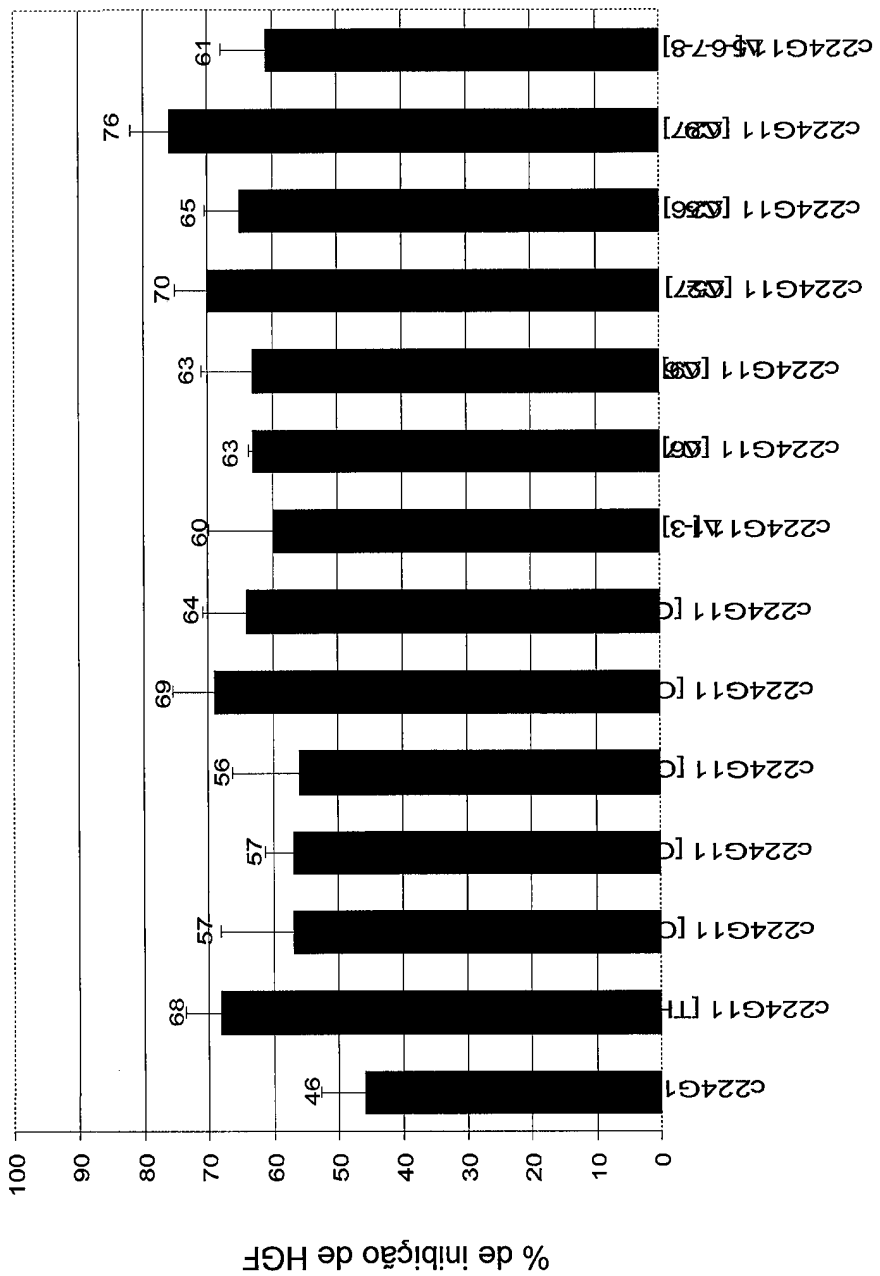

% de inibição de HGF
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
c224G1
c224G11 [TH
c224G11 [C
c224G11 [C
c224G11 [C
c224G11 [C
c224G11 [C
c224G11 [C
c224G11 [
c224G11 [
c224G11 [
c224G11 [
c224G11 [
46
68
57
57
69
56
64
60
63
63
70
65
76
61

FIG. 17B

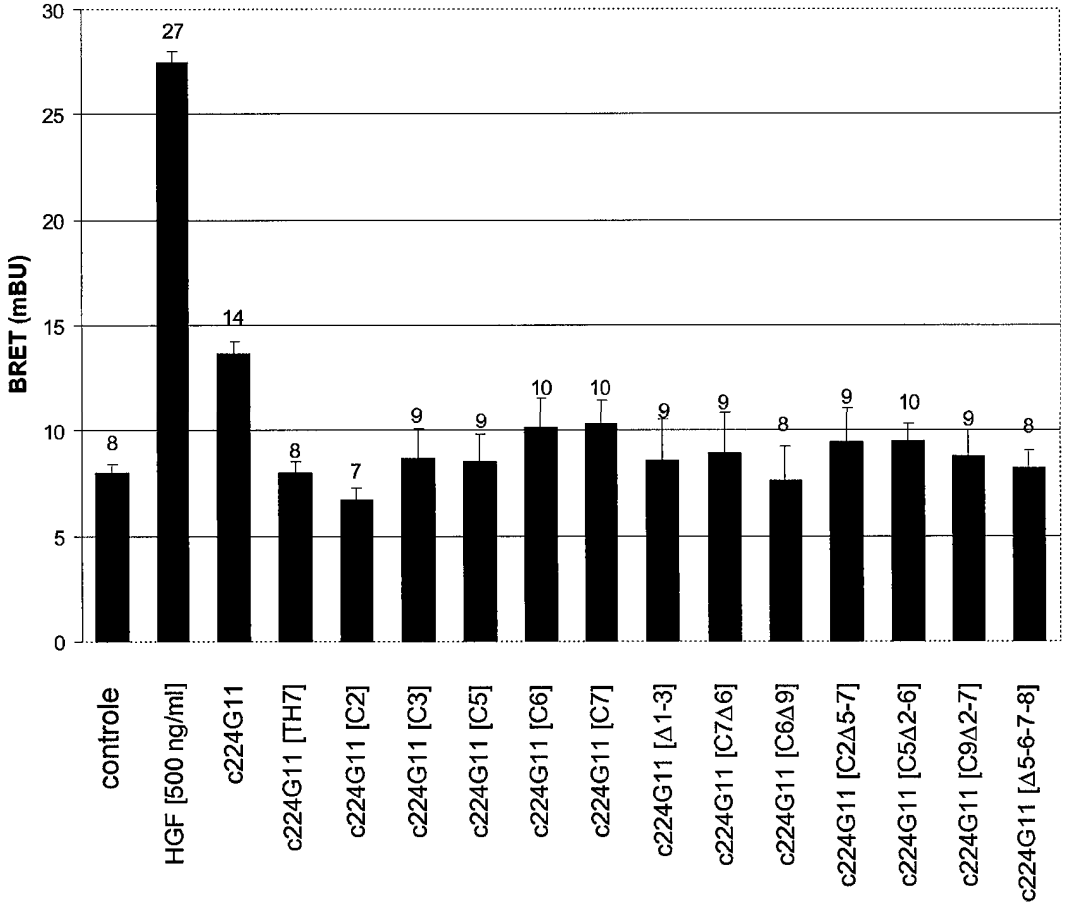
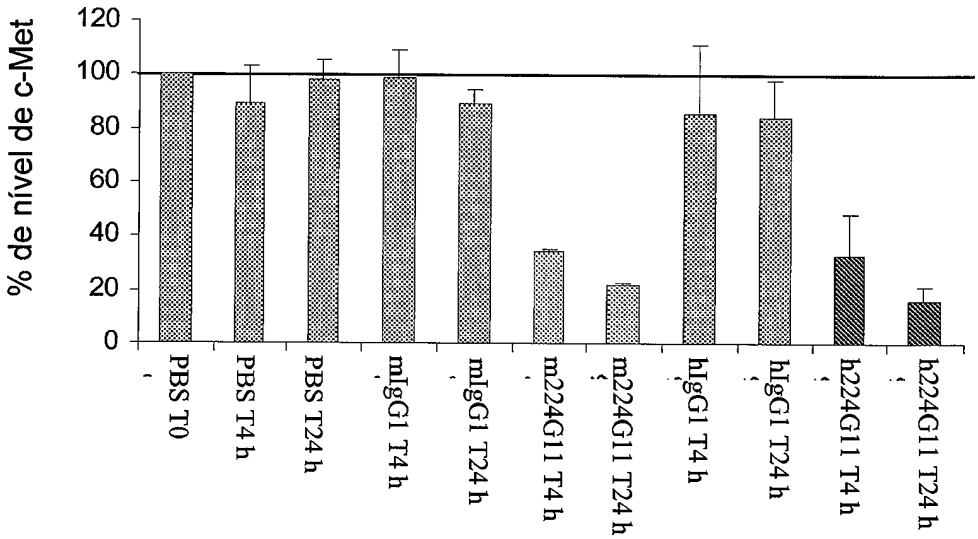

BRET (mBU)
30
25
20
15
10
5
0
8
27
14
8
7
9
9
10
10
9
9
8
9
10
9
8
controle
HGF [500 ng/ml]
c224G11
c224G11 [TH7]
c224G11 [C2]
c224G11 [C3]
c224G11 [C5]
c224G11 [C6]
c224G11 [C7]
c224G11 [Δ1-3]
c224G11 [C7Δ6]
c224G11 [C6Δ9]
c224G11 [C2Δ5-7]
c224G11 [C5Δ2-6]
c224G11 [C9Δ2-7]
c224G11 [Δ5-6-7-8]

FIG. 18

A


% de nível de c-Met
120
100
80
60
40
20
0
PBS T0
PBS T4 h
PBS T24 h
mIgG1 T4 h
mIgG1 T24 h
m224G11 T4 h
m224G11 T24 h
hIgG1 T4 h
hIgG1 T24 h
h224G11 T4 h
h224G11 T24 h

B

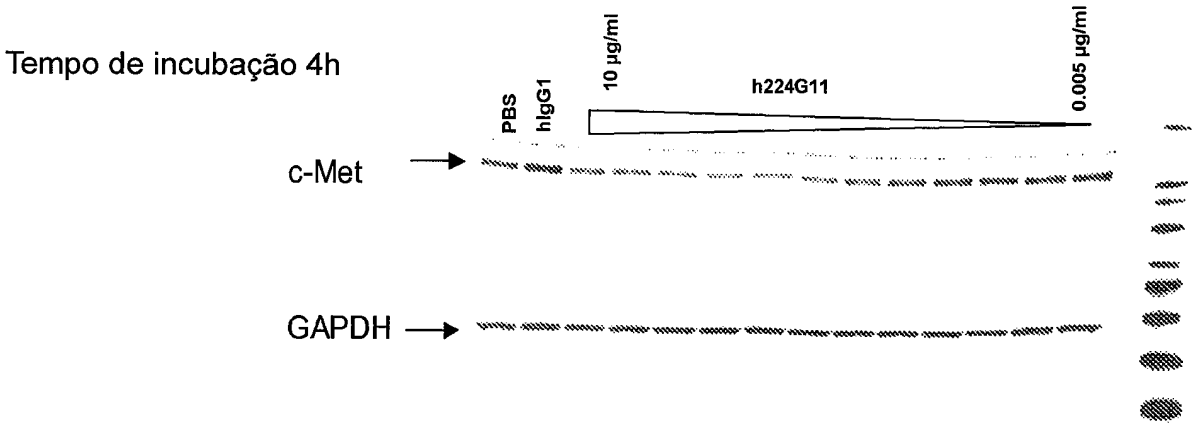
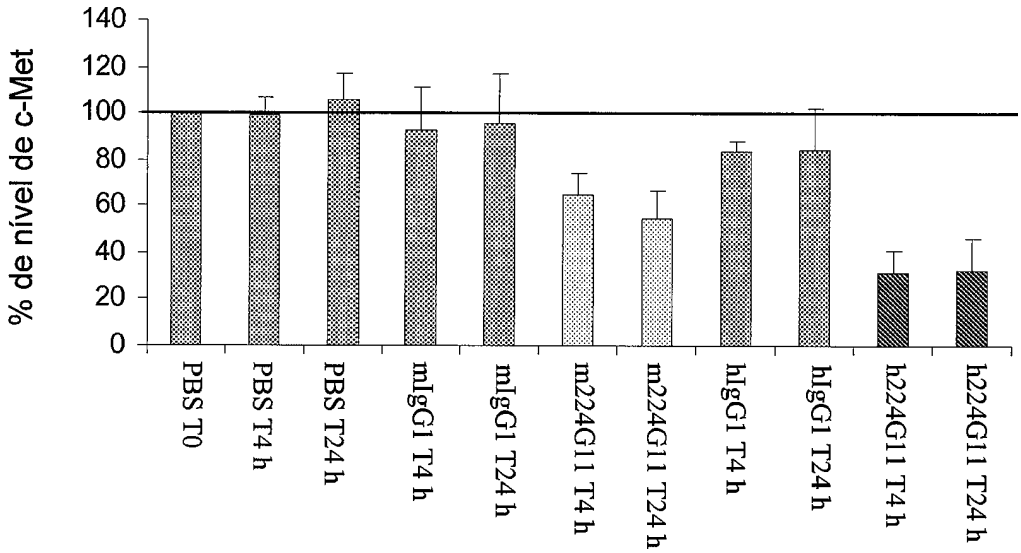

Tempo de incubação 4h
PBS
hIgG1
10 µg/ml
h224G11
0.005 µg/ml
c-Met
GAPDH

FIG. 19

A


% de nível de c-Met
140
120
100
80
60
40
20
0
PBS T0
PBS T4 h
PBS T24 h
mIgG1 T4 h
mIgG1 T24 h
m224G11 T4 h
m224G11 T24 h
hIgG1 T4 h
hIgG1 T24 h
h224G11 T4 h
h224G11 T24 h

B

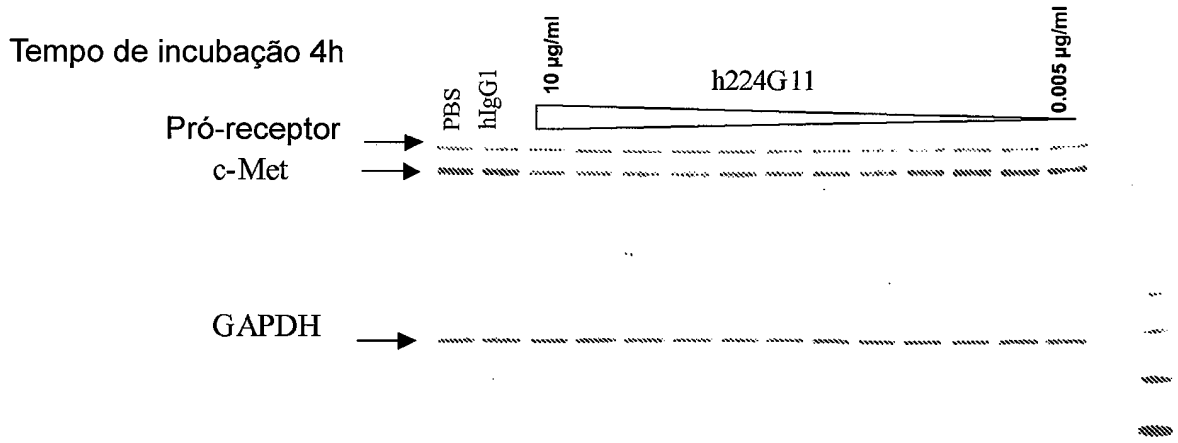

Tempo de incubação 4h
PBS
hIgG1
10 µg/ml
h224G11
0.005 µg/ml
Pró-receptor
c-Met
GAPDH

FIG. 20

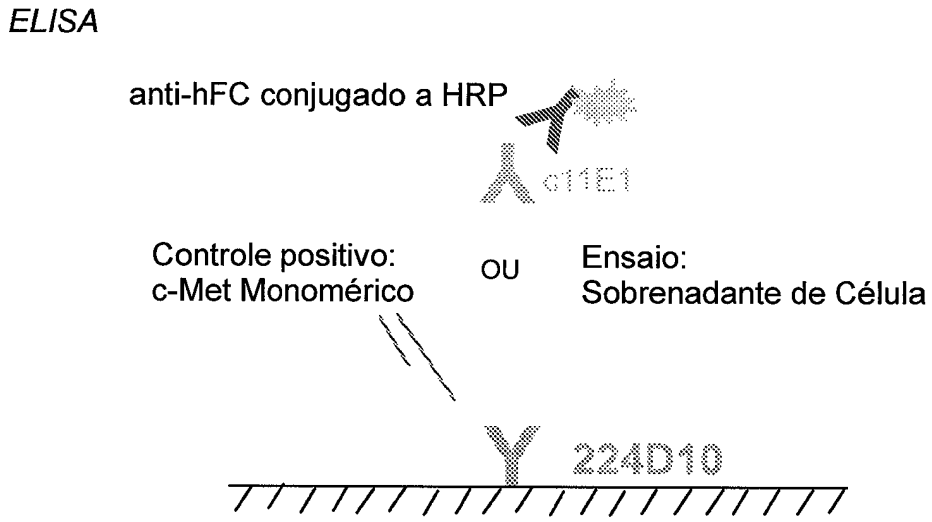

ELISA
anti-hFC conjugado a HRP
c11E1
Controle positivo:
c-Met Monomérico
OU
Ensaio:
Sobrenadante de Célula
224D10

FIG. 21

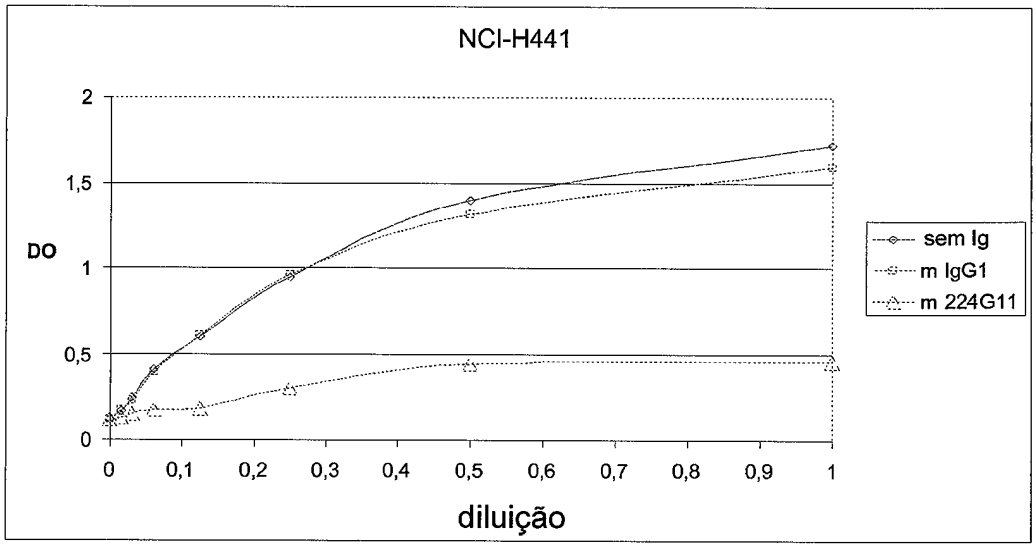

NCI-H441
DO
2
1,5
1
0,5
0
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1
diluição
sem Ig
m IgG1
m 224G11

FIG. 22

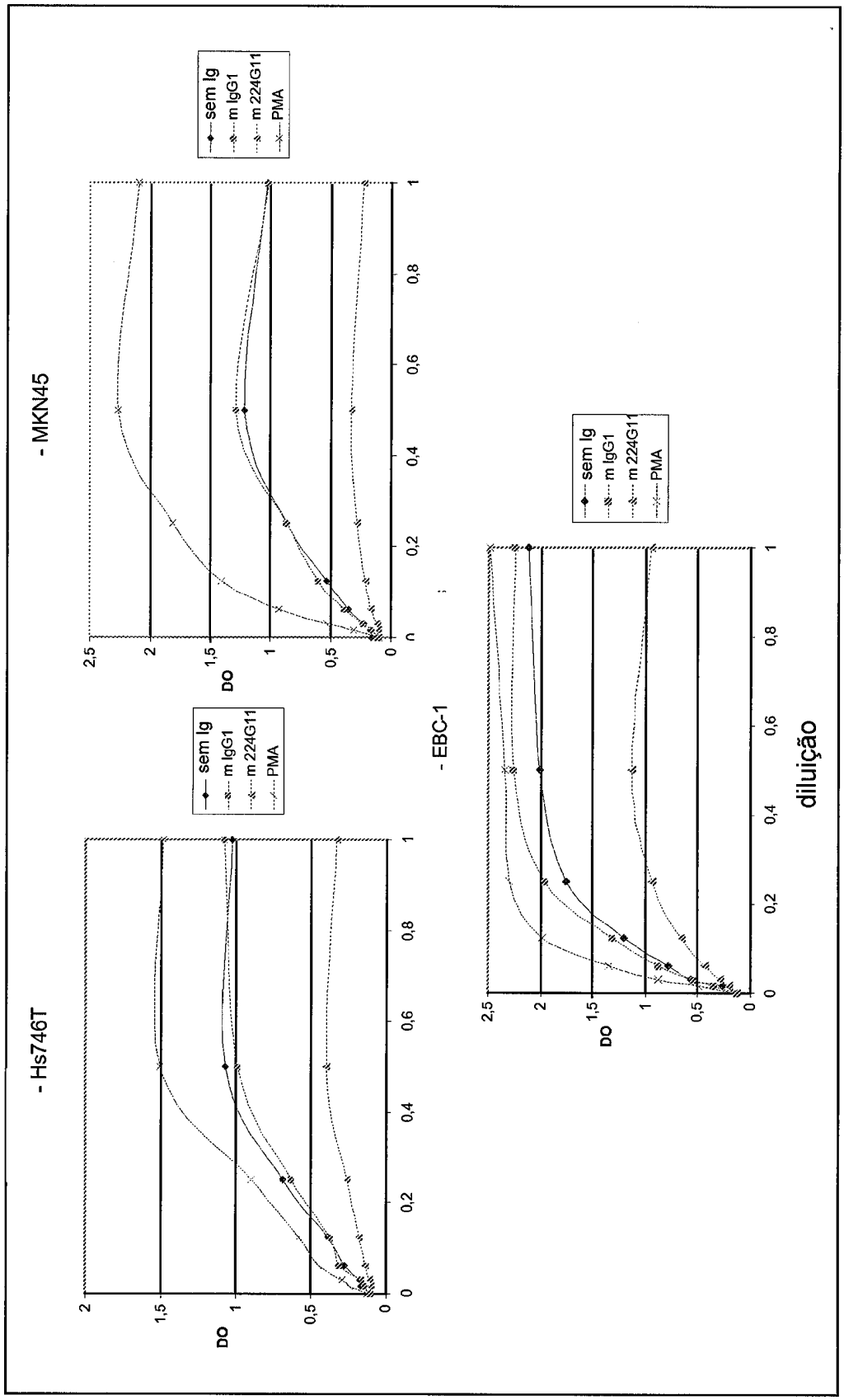


FIG. 23

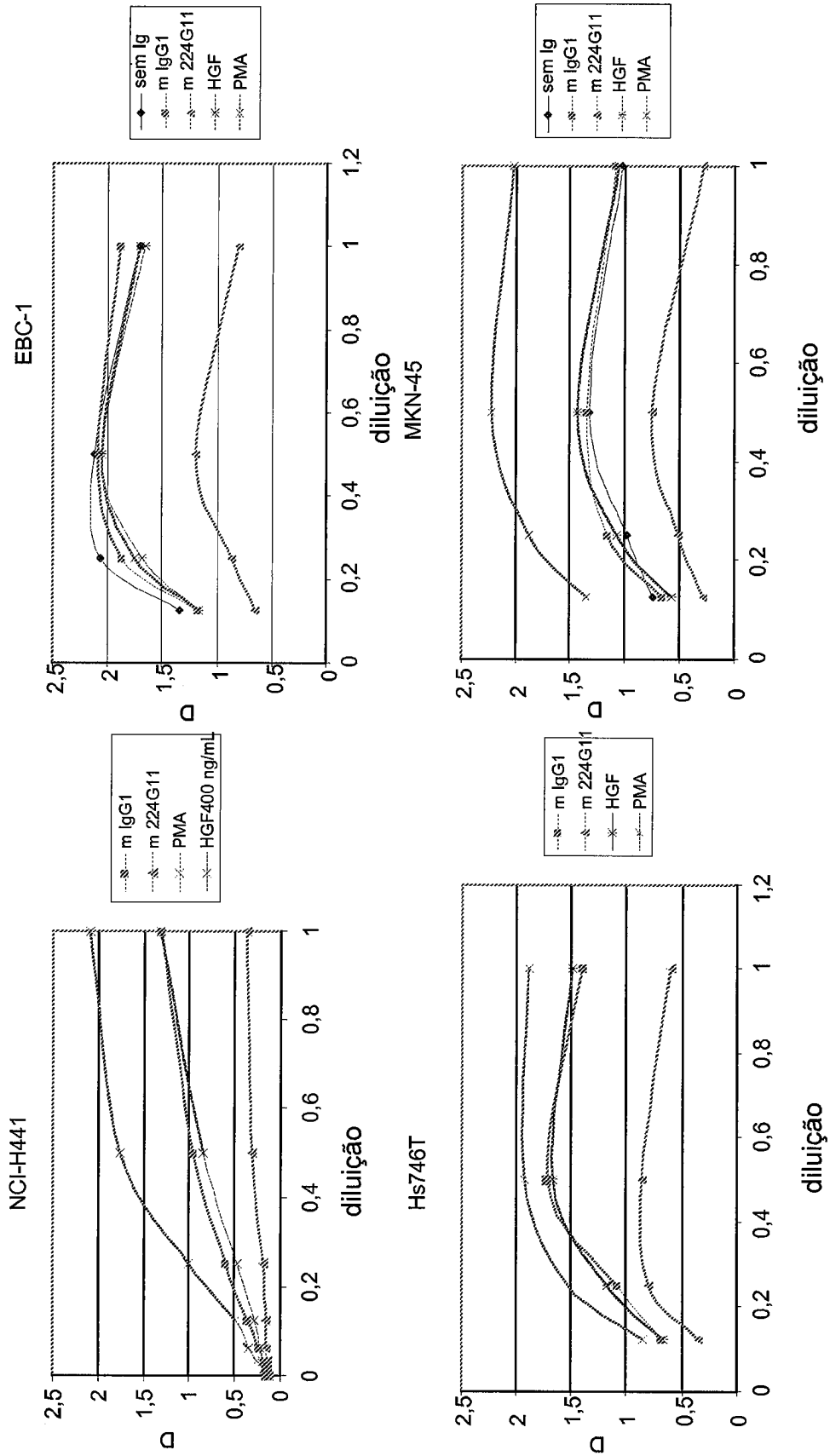

EBC-1
sem Ig
m IgG1
m 224G11
HGF
PMA
MKN-45
NCI-H441
m IgG1
m 224G11
PMA
HGF400 ng/mL
Hs746T
diluição
D

FIG. 24

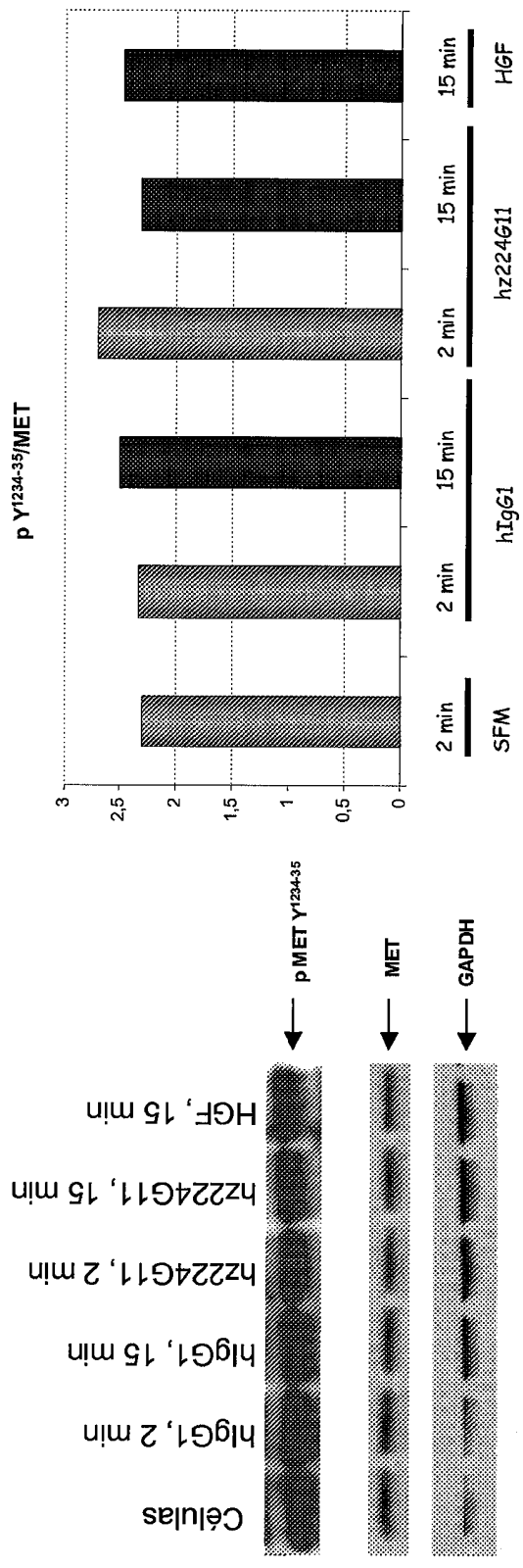

Células
hIgG1, 2 min
hIgG1, 15 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
2 min
SFM
2 min
15 min
hIgG1
2 min
15 min
hz224G11
15 min
HGF

FIG. 25

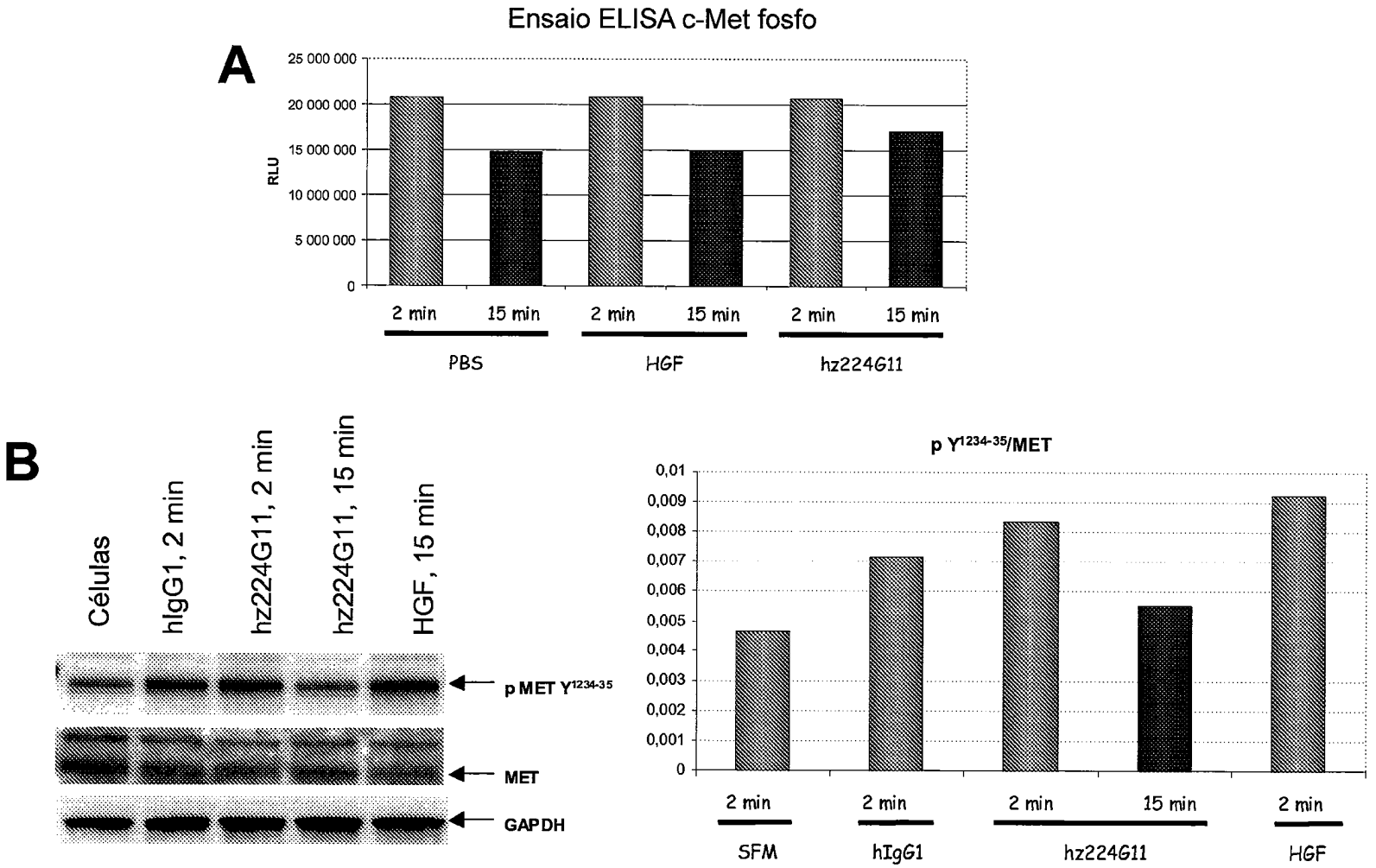

A
Ensaio ELISA c-Met fosfo
RLU
25 000 000
20 000 000
15 000 000
10 000 000
5 000 000
0
2 min
15 min
2 min
15 min
2 min
15 min
PBS
HGF
hz224G11
B
Células
hIgG1, 2 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
0,01
0,009
0,008
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
2 min
2 min
2 min
15 min
2 min
SFM
hIgG1
hz224G11
HGF

FIG. 26

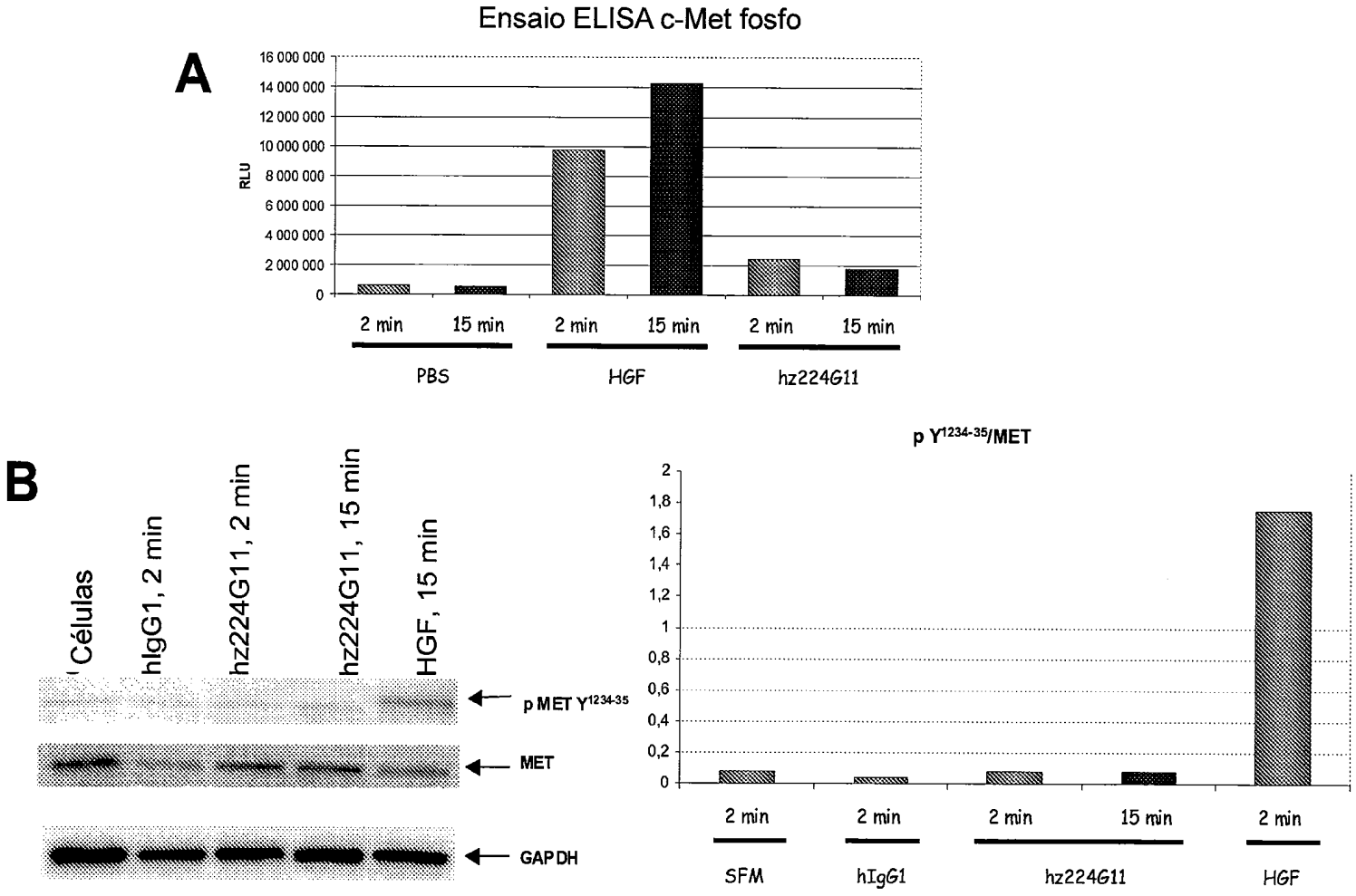

Ensaio ELISA c-Met fosfo
A
RLU
16 000 000
14 000 000
12 000 000
10 000 000
8 000 000
6 000 000
4 000 000
2 000 000
0
2 min
15 min
2 min
15 min
2 min
15 min
PBS
HGF
hz224G11
B
Células
hIgG1, 2 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2 min
2 min
2 min
15 min
2 min
SFM
hIgG1
hz224G11
HGF

FIG. 27

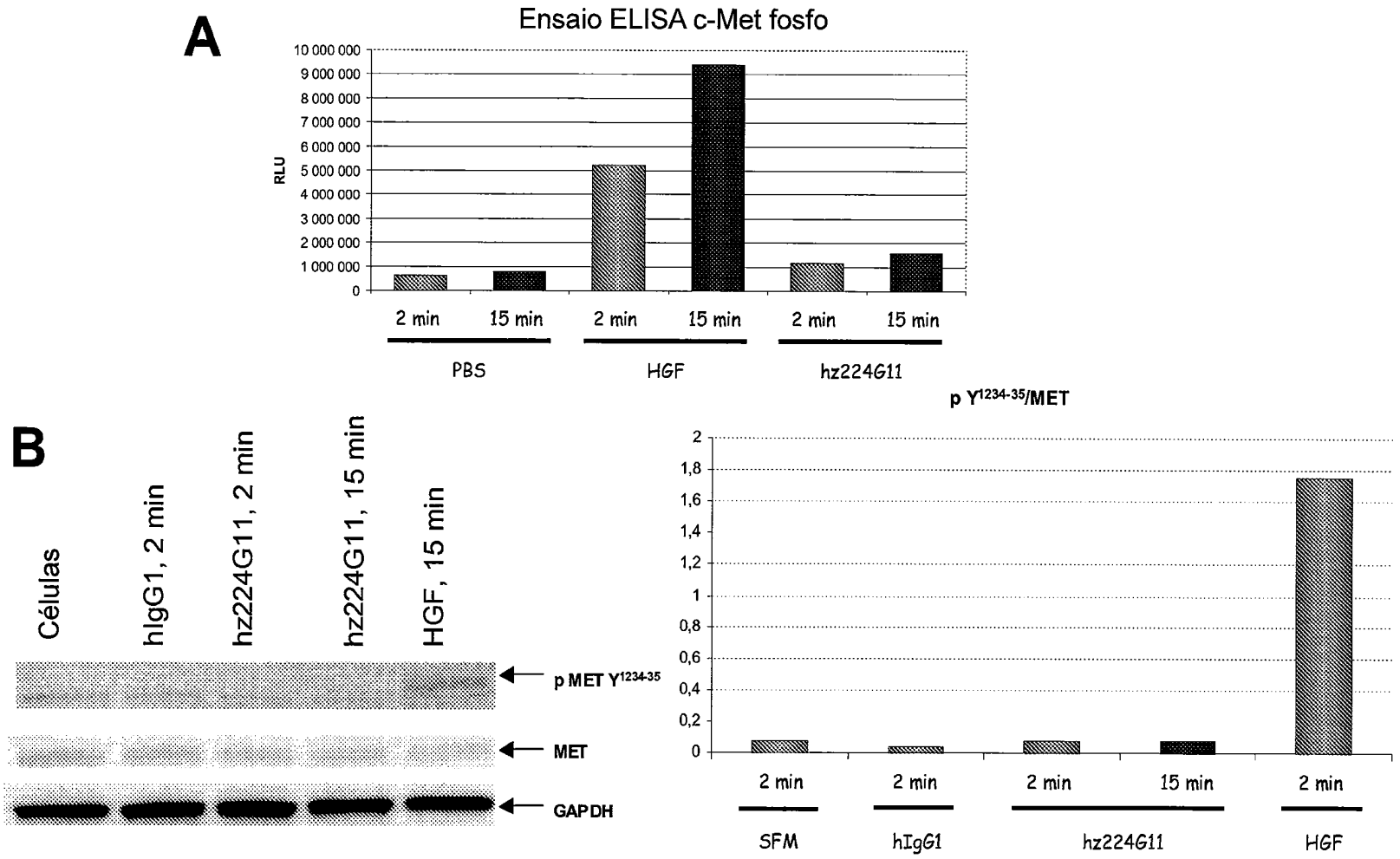

A
Ensaio ELISA c-Met fosfo
RLU
10 000 000
9 000 000
8 000 000
7 000 000
6 000 000
5 000 000
4 000 000
3 000 000
2 000 000
1 000 000
0
2 min
15 min
2 min
15 min
2 min
15 min
PBS
HGF
hz224G11
B
Células
hIgG1, 2 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2 min
2 min
2 min
15 min
2 min
SFM
hIgG1
hz224G11
HGF

FIG. 28

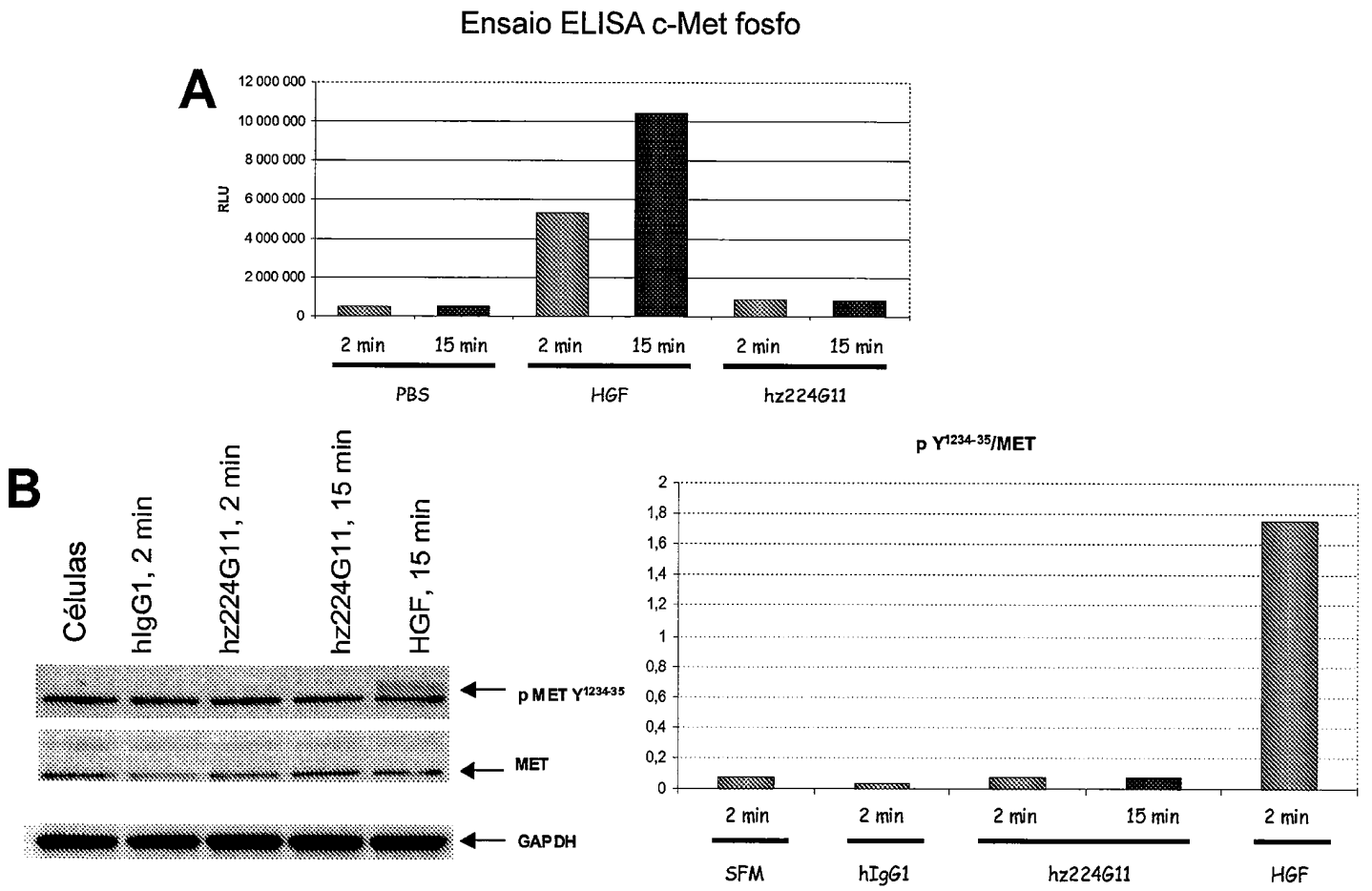
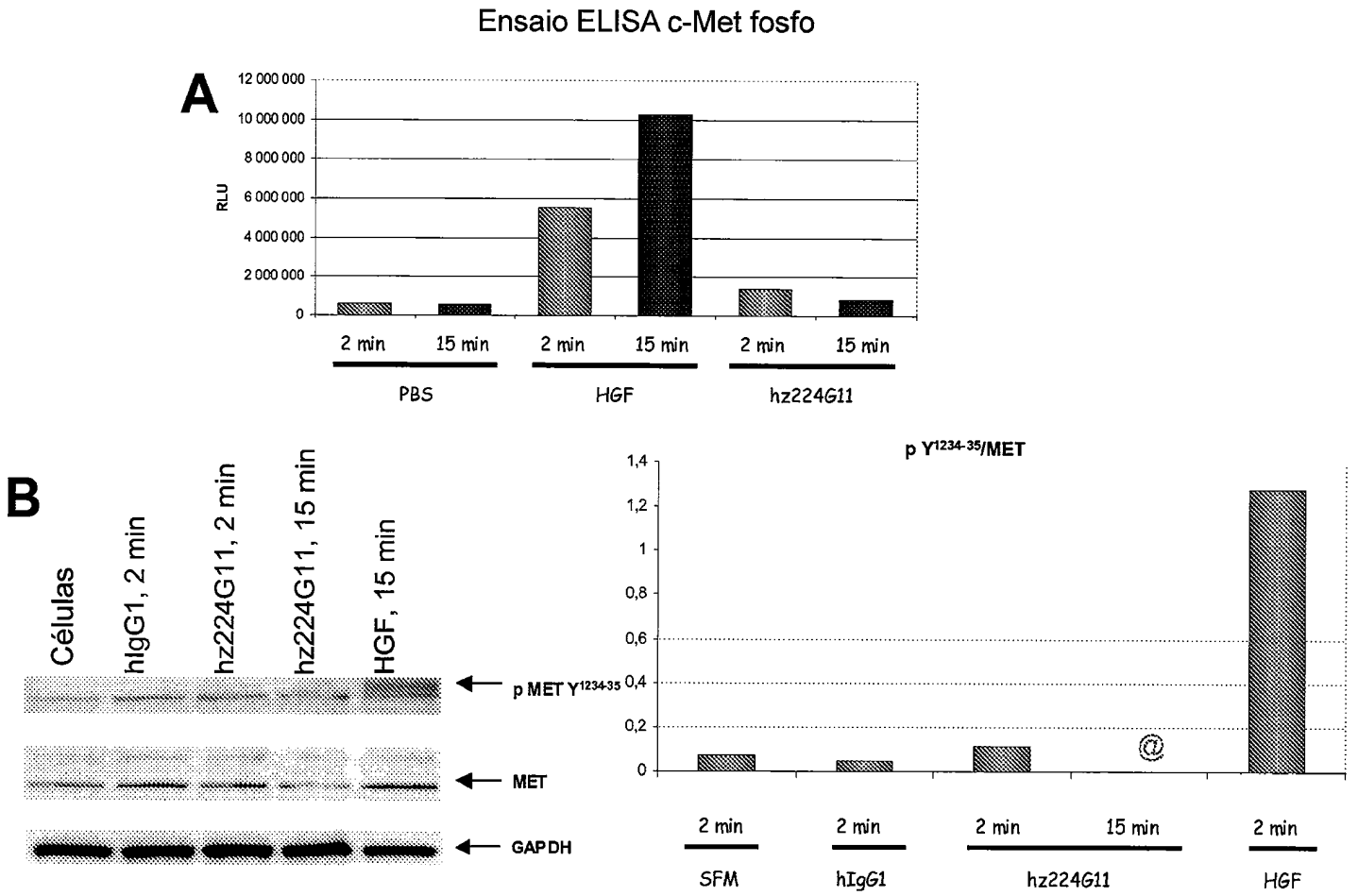

Ensaio ELISA c-Met fosfo
A
RLU
12 000 000
10 000 000
8 000 000
6 000 000
4 000 000
2 000 000
0
2 min
15 min
2 min
15 min
2 min
15 min
PBS
HGF
hz224G11
B
Células
hIgG1, 2 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2 min
2 min
2 min
15 min
2 min
SFM
hIgG1
hz224G11
HGF

FIG. 29



@ Sombra na linha de Western Blot

FIG. 30

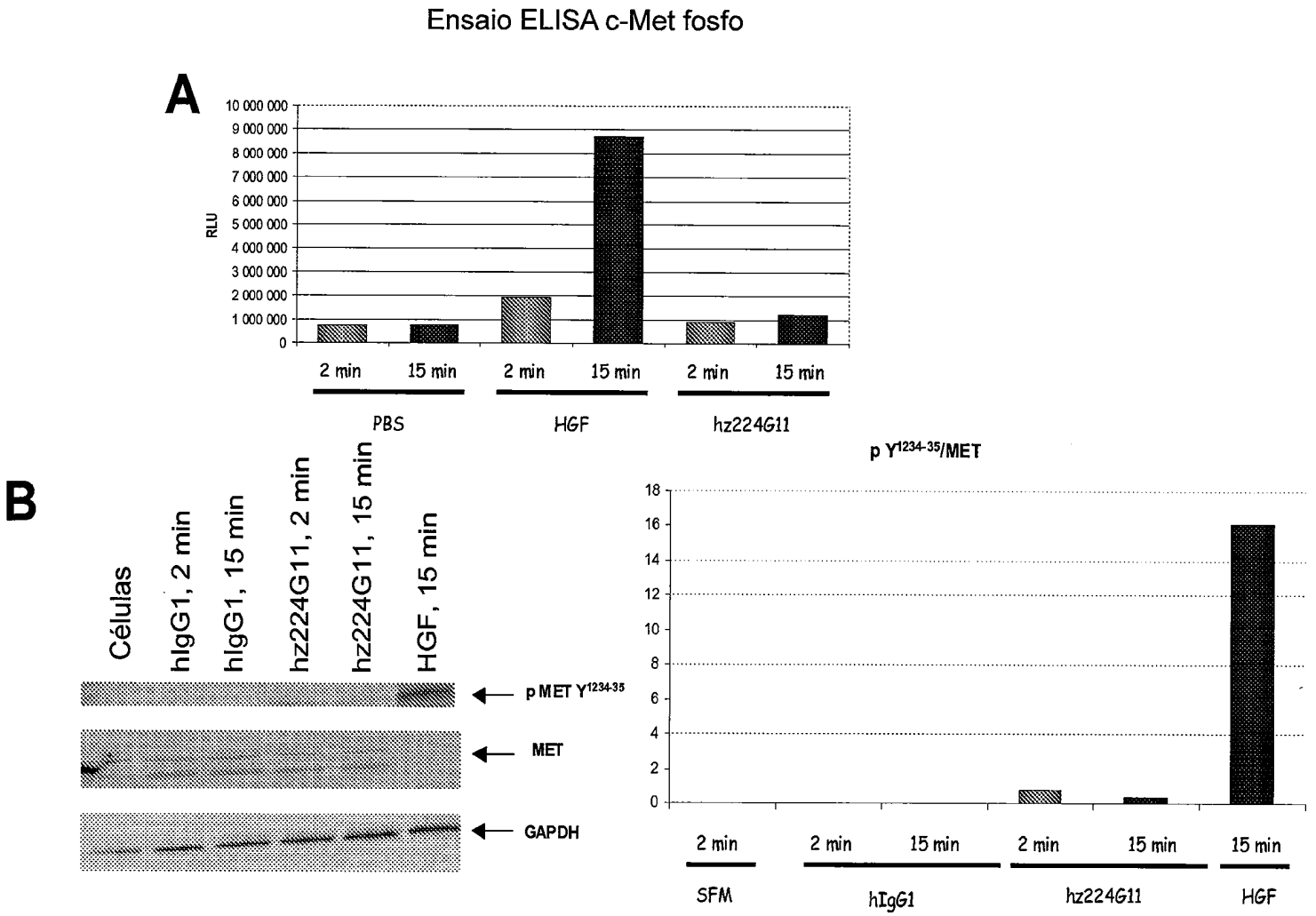

Ensaio ELISA c-Met fosfo
A
RLU
10 000 000
9 000 000
8 000 000
7 000 000
6 000 000
5 000 000
4 000 000
3 000 000
2 000 000
1 000 000
0
2 min
15 min
2 min
15 min
2 min
15 min
PBS
HGF
hz224G11
B
Células
hIgG1, 2 min
hIgG1, 15 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
2 min
2 min
15 min
2 min
15 min
15 min
SFM
hIgG1
hz224G11
HGF

FIG. 31

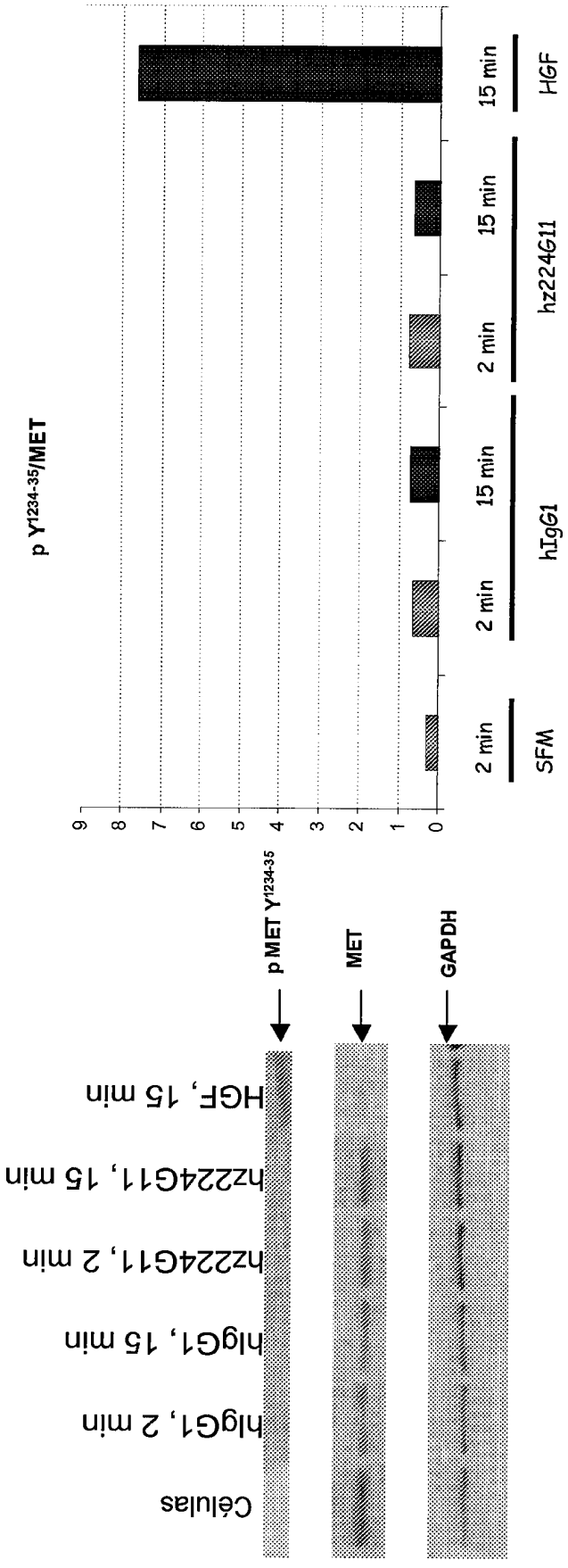

Cellules
hIgG1, 2 min
hIgG1, 15 min
hz224G11, 2 min
hz224G11, 15 min
HGF, 15 min
p MET Y1234-35
MET
GAPDH
p Y1234-35/MET
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
2 min
2 min
15 min
2 min
15 min
15 min
SFM
hIgG1
hz224G11
HGF

FIG. 32

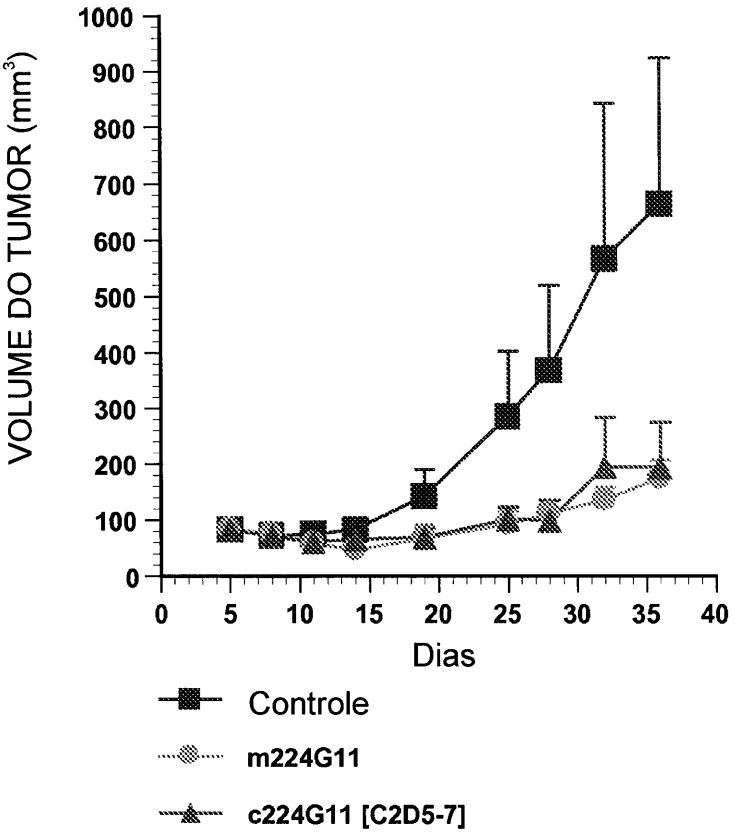

VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dias
Controle
m224G11
c224G11 [C2D5-7]

FIG. 33

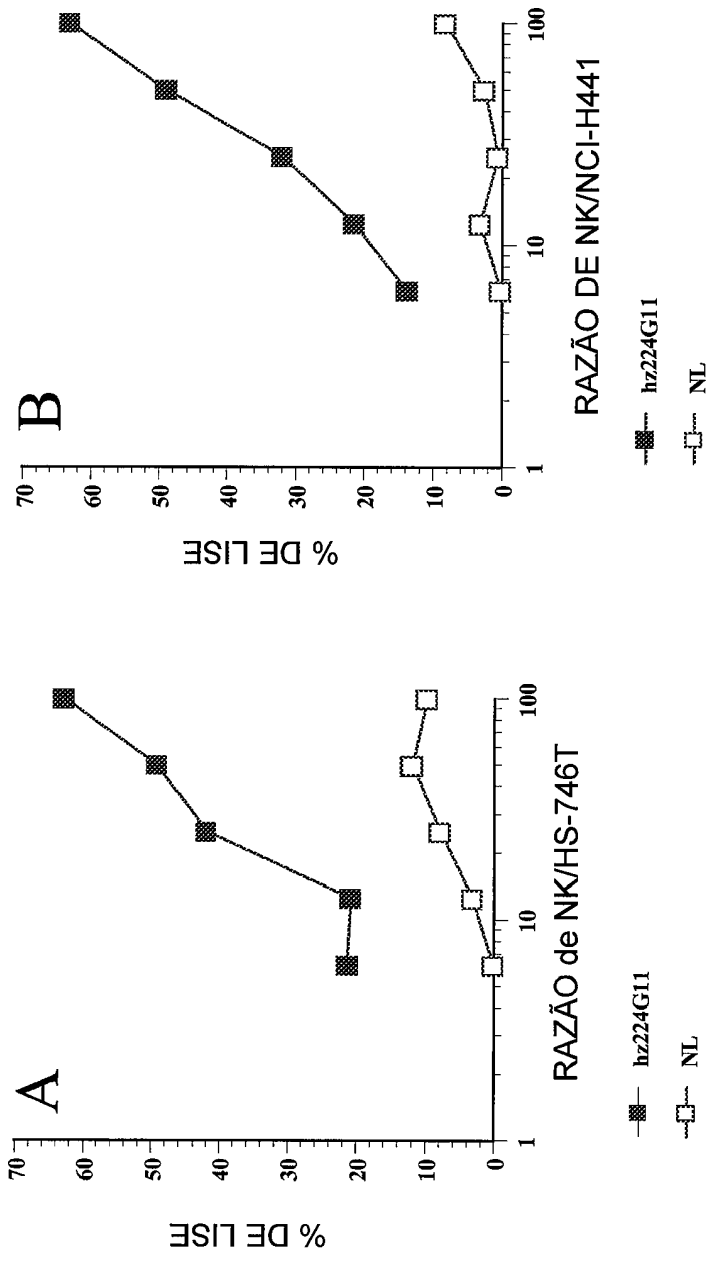
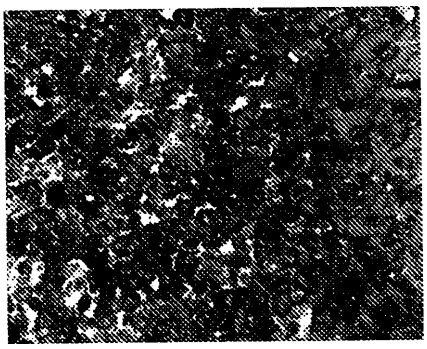
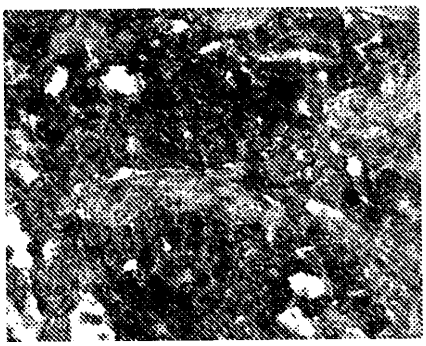

A
% DE LISE
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
RAZÃO de NK/HS-746T
hz224G11
NL
B
% DE LISE
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
RAZÃO DE NK/NCI-H441
hz224G11
NL

FIG. 34

A



B



C

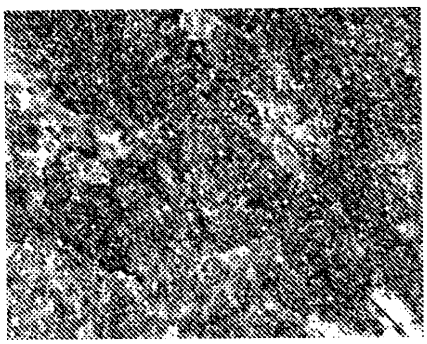


FIG. 35