



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

(11) PI 9809387-8 B1



(22) Data do Depósito: 03/04/1998

(45) Data de Concessão: 22/11/2016

**(54) Título:** ANTICORPO HUMANIZADO ANTI-FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR HUMANO E COMPOSIÇÃO QUE O COMPREENDE

(51) Int.Cl.: C07K 16/00

(30) Prioridade Unionista: 06/08/1997 US 08/908,469, 07/04/1997 US 08/833,504

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

(72) Inventor(es): MANUEL BACA, JAMES A. WELLS, LEONARD G. PRESTA, HENRY B. LOWMAN, YVONNE MAN-YEE CHEN

**ANTICORPO HUMANIZADO ANTI-FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR HUMANO E COMPOSIÇÃO QUE O COMPREENDE**

**REFERÊNCIAS CRUZADAS**

[001] Este pedido é uma continuação em parte de co-pendência do Pedido U. S. nº 08/833.504, depositado em 7 de abril de 1997, cujo pedido é incorporado aqui por referência e a cujo pedido prioritariamente é reivindicado sob 35 U.S.C. § 120.

**FUNDAMENTO DA INVENÇÃO**

**Campo da Invenção**

[002] Esta invenção refere-se geralmente a anticorpos anti-VEGF e, em particular, a anticorpos humanizados anti-VEGF

**Descrição de Técnica Relacionada**

[003] Está agora bem estabelecido que a angiogênese é implicada na patogênese de diversos distúrbios. Estes incluem tumores sólidos, síndromes neovasculares intraocular, tais como retinopatias proliferativas ou degeneração macular relacionada com a idade (AMD), artrite reumatóide, e psoríase (Folkman *e outros J. Biol. Chem.* 267: 10931 - 10934 (1992); Klagsbrun *e outros Annu. Rev. Physiol.* 53: 217 a 239 (1991); e Garner A, *Vascular diseases. In: Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach.* Garner A, Klintworth GK, Eds. 2<sup>a</sup> Edição Marcel Dekker, NY, pp 1625 a 1710 (1994)). No caso de tumores sólidos, a neovascularização permite as células de tumor obter uma vantagem de crescimento e autonomia proliferativa comparado com as células normais. Portanto, uma correlação foi observada entre a densidade de microvasos em seções de tumor e sobrevivência de paciente em câncer da mama bem como em diversos outros tumores (Weidner *e outros. N. Engl. J. Med.* 324: 1 - 6 (1991); Horak *e outros Lancet* 340: 1120 - 1124 (1992); e Macchiarini *e outros Lancet* 340: 145 - 146 (1992)).

[004] A pesquisa para reguladores positivos de angiogênese tem produzido

muitos candidatos incluindo aFGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, TNF- $\alpha$ , angiogênina, IL-8, etc. (Folkman e outros e Klagsbrun e outros). Os reguladores negativos até agora identificados incluem trombospondina (Good e outros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6624 - 6628 (1990)), o fragmento de extremidade N de 16 kilodáltons de prolactina (Clapp e outros. *Endocrinology*, 133: 1292 -1299 (1993)), angiostatina (O'Reilly e outros. *Cell*, 79: 315 - 328 (1994)) e endostatina (O'Reilly e outros. *Cell*, 88; 277 - 285 (1996)).

[005] Trabalho realizado durante os vários últimos anos estabeleceu o papel chave do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na regulação de angiogênese normal ou anormal (Ferrara e outros. *Endocr. Rev.* 18: 4-25 (1997)). A descoberta de que a perda de mesmo um único alelo VEGF resulta em pontos de letalidade embriônica em um papel insubstituível desempenhado por este fator no desenvolvimento e diferenciação do sistema vascular (Ferrara e outros). Além disso, o VEGF mostrou ser um mediador chave de neovascularização associada com tumores e distúrbios intraoculares (Ferrara e outros). O VEGF mRNA é superexpresso pela maioria de tumores humanos examinados (Berkman e outros. *J. Clin Invest* 91: 153 - 159 (1993); Brown e outros. *Human Pathol.* 26: 86 - 91 (1995); Brown e outros. *Cancer Res.* 53: 4727 - 4735 (1993); Mattern e outros. *Brit. J. Cancer.* 73: 931 - 934 (1996); e Dvorak e outros. *Am J. Pathol.* 146: 1029 - 1039 (1995)). Também, a concentração de VEGF em fluidos para os olhos é altamente correlacionada com a presença de proliferação ativa de vasos sanguíneos em pacientes com retinopatias diabéticas e outras retinopatias relacionadas com isquemia (Aleppo e outros. *N. Engl. J. Med.* 331: 1480 - 1487 (1994)). Além disso, recentes estudos demonstraram a localização de VEGF em membranas neovasculares coroidais em pacientes afetados por AMD (Lopez e outros. *Invest. Oftalmo. Vis. Sci.* 37: 855 - 868 (1996)). Os anticorpos de neutralização anti-VEGF suprimem o crescimento de diversas linhagens de célula de tumor humano

em camundongo nu (Kim e outros. *Nature* 362: 841 - 844 (1993); Warren e outros. *J. Clin. Invest.* 95: 1789 - 1797 (1995), Borgström e outros. *Cancer Res.* 56: 4032 - 4039 (1996); e Melnyk e outros. *Cancer Res.* 56: 921 - 924 (1996)) e também inibem angiogênese intraocular em modelos de distúrbios retinais isquêmicos (Adamis e outros. *Arch. Ophthalmol.* 114: 66 - 71 (1996)). Portanto, os anticorpos monoclonais anti-VEGF ou outros inibidores de ação VEGF são candidatos promissores para o tratamento de tumores sólidos e vários distúrbios neovasculares intraoculares.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Este pedido descreve anticorpos anti-VEGF humanizados e variantes de anticorpo anti-VEGF com propriedades desejáveis de uma perspectiva terapêutica, incluindo forte afinidade de ligação para VEGF, a capacidade de inibir a proliferação induzida por VEGF de células endoteliais *in vitro*; e a capacidade de inibir angiogênese induzida por VEGF *in vivo*.

[007] O anticorpo anti-VEGF humanizado preferido ou anticorpo anti-VEGF variante aqui liga VEGF humano com um valor  $K_d$  de não mais do que cerca de  $1 \times 10^{-8} M$  e preferivelmente não mais do que cerca de  $5 \times 10^{-9} M$ . Além disso, o anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante pode ter um valor ED50 de não mais do que cerca de 5 nM para inibir a proliferação induzida por VEGF de células endoteliais *in vitro*. Os anticorpos anti-VEGF humanizados ou variante de particular interesse aqui são aqueles que inibem pelo menos 50% de crescimento de tumor em um modelo de tumor *in vivo* A673, em uma dose de anticorpo de 5 mg/kg.

[008] Em uma modalidade, o anticorpo anti-VEGF tem um domínio variável de cadeia pesada e leve, onde o domínio variável de cadeia pesada compreende regiões hipervariáveis com as seguintes Sequências aminoácidas: CDRH1 (GYX<sub>1</sub>FTX<sub>2</sub>YGMN, onde X<sub>1</sub> é T ou D e X<sub>2</sub> é N ou H; SEQ ID NO:128), CDRH2

(WINTYTGEPTYAADFKR; SEQ ID NO:2) e CDRH3 (YPX<sub>1</sub>YYGX<sub>2</sub>SHWYFDV, onde X<sub>1</sub> é Y ou H e X<sub>2</sub> é S ou T; SEQ ID NO:129). Por exemplo, o domínio variável de cadeia pesada pode compreender as Sequências aminoácidas de CDRH1 (GYT-FTNYGMN; SEQ ID NO:1), CDRH2 (WINTYTGEPTYAADFKR; SEQ ID NO:2) e CDRH3 (YPHYYGSSHWYFDV; SEQ ID NO:3). Preferivelmente, as três regiões hipervariáveis de cadeia pesada são fornecidas em uma região de estruturação humana, por exemplo, uma Sequência contígua representada pela seguinte fórmula: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4.

[009] A invenção ainda fornece um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo anti-VEGF compreendendo a Sequência aminoácida:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYX<sub>1</sub>FTX<sub>2</sub>YGMNWVR-  
QAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFRRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA-  
VYYCAKYPX<sub>3</sub>YYGX<sub>4</sub>SHWYFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:125),

onde X<sub>1</sub> é T ou D; X<sub>2</sub> é N ou H, X<sub>3</sub> é Y ou H e X<sub>4</sub> é S ou T. Uma Sequência de domínio variável de cadeia pesada particularmente útil é aquele do anticorpo humanizado F(ab)-12 de Exemplo 1 e compreende a Sequência de domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO:7. Tais Sequências de domínio variável de cadeia pesada preferidas podem ser combinadas com as seguintes Sequências de domínio variável de cadeia leve preferido ou com outras Sequências de domínio variável de cadeia leve, contanto que o anticorpo assim produzido ligue VEGF humano.

[0010] A invenção também fornece Sequências de domínio variável de cadeia leve preferidas que podem ser combinadas com as Sequências de domínio variável de cadeia pesada acima identificadas ou com outras Sequências de domínio variável de cadeia pesada, contanto que o anticorpo assim produzido conserve a capacidade de ligar-se a VEGF humano. Por exemplo, o domínio variável

de cadeia leve pode compreender regiões hipervariáveis com as seguintes Sequências aminoácidas: CDRL1 (SSASQDISNYLN; SEQ ID NO:4), CDRL2 (FTSSLHS; SEQ ID NO:5) e CDRL3 (QQYSTVPWT; SEQ ID NO: 6). Preferivelmente, as três regiões hipervariáveis de cadeia leve são providas em uma região de estrutura humana, por exemplo, como uma Sequência contígua representada pela seguinte fórmula: FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4.

[0011] Em uma modalidade, a invenção fornece um domínio variável de cadeia leve de anticorpo anti-VEGF humanizado, compreendendo a Sequência aminoácida:

DIQX<sub>1</sub>TQSPSSLSASVGDRVITCSASQDISNYLNWYQQKPGKPGKAPKVLIYFTSS-LHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:124), onde X<sub>1</sub> é M ou L. Uma Sequência de domínio variável de cadeia leve particularmente útil é aquela do anticorpo humanizado F(ab)-12 de Exemplo 1, e compreende a Sequência de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO:8.

[0012] A invenção também fornece uma variante de um anticorpo anti-VEGF parental (cujo anticorpo parental é preferivelmente um anticorpo anti-VEGF humanizado ou humano), onde a variante liga VEGF humano e compreende uma substituição de aminoácido em uma região hipervariável do domínio variável de cadeia pesada ou leve do anticorpo anti-VEGF parental. A variante preferivelmente tem uma ou mais substituições em uma ou mais regiões hipervariáveis do anticorpo anti-VEGF. Preferivelmente, a(s) substituição(ões) estão no domínio variável de cadeia pesada do anticorpo parental. Por exemplo, a(s) substituições de aminoácidos podem ser no CDRH1 e/ou CDRH3 do domínio variável de cadeia pesada. Preferivelmente, existem substituições em ambas destas regiões hipervariáveis. Tais variantes de “maturidade de afinidade” são demonstradas aqui para ligar VEGF humano mais fortemente do que o anticorpo anti-VEGF parental do qual eles são gerados, isto é, eles têm um valor K<sub>d</sub> que é

significamente menor do que o anticorpo anti-VEGF parental. Preferivelmente, a variante tem um valor ED<sub>50</sub> para inibição de proliferação induzida por VEGF de células endoteliais *in vitro* que é pelo menos de cerca de 10 vezes menor, preferivelmente de pelo menos cerca de 20 vezes menor, e mais preferivelmente pelo menos 50 vezes menor, do que aquele do anticorpo anti-VEGF parental. Uma variante particularmente preferida é a variante Y0317 de Exemplo 3, que tem um CDRH1 compreendendo a Sequência de aminoácido: GYDFTHYGMN (SEQ ID NO:126) e um CDRH3 compreendendo a Sequência de aminoácido: YPYYYGTSHWYFDV (SEQ ID NO:127). Estas regiões hipervariáveis e CDRH2 são geralmente providas em uma região de estrutura humana, por exemplo, resultando em um domínio variável de cadeia pesada compreendendo a Sequência de aminoácido de SEQ ID NO:116. Tais Sequências de domínio variáveis de cadeia pesada são opcionalmente combinadas com um domínio variável de cadeia leve compreendendo a Sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 124, e preferivelmente a Sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 115.

[0013] Várias formas do anticorpo são aqui contempladas. Por exemplo, o anticorpo anti-VEGF pode ser um anticorpo de comprimento natural (por exemplo tendo uma região Fc humana intacta) ou um fragmento de anticorpo (por exemplo, um Fab, Fab' ou F(ab')<sub>2</sub>). Além disso, o anticorpo pode ser rotulado com um rótulo detectável, imobilizado em uma fase sólida e/ou conjugada com um composto heterólogo (tal como um agente citotóxico).

[0014] Os empregos diagnósticos e terapêuticos para o anticorpo são contemplados. Em uma aplicação diagnóstica, a invenção fornece um método para determinar a presença de proteína VEGF compreendendo expor uma amostra suspeita de conter a proteína VEGF ao anticorpo anti-VEGF e determinar a liga-

ção do anticorpo à amostra. Para este uso, a invenção fornece um kit compreendendo o anticorpo e instruções para usar o anticorpo para detectar a proteína VEGF.

[0015]A invenção ainda fornece: ácido nucléico isolado codificando o anticorpo; um vetor compreendendo aquele ácido nucléico, opcionalmente operavelmente ligado a Sequências de controle reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vetor; uma célula hospedeira compreendendo aquele vetor; um processo para produzir o anticorpo compreendendo cultivar a célula hospedeira a fim do ácido nucléico ser expresso e, opcionalmente, recuperar o anticorpo da cultura da célula hospedeira (por exemplo, do meio de cultura da célula hospedeira). A invenção também fornece uma composição compreendendo o anticorpo anti-VEGF e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. A composição para uso terapêutico é estéril e pode ser liofilizada. A invenção ainda fornece um método para tratar um mamífero sofrendo de um tumor ou distúrbio retinal, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-VEGF ao mamífero.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] As Figuras 1A e 1B representam as Sequências amino-ácidas de domínio pesado variável (SEQ ID NO: 9) e domínio leve (SEQ ID NO:10) de muMAb-VEGF A.4.6.1, domínio pesado variável (SEQ ID NO:7) e domínio leve (SEQ ID NO: 8) de F(ab) (F(ab)-12) humanizado e estruturas de consenso humano (hum III para subgrupo pesado III (SEQ ID NO:11); humk1 para k leve subgrupo I (SEQ ID NO:12). A Figura 1A alinha Sequências de domínio pesado variável e Figura 1B alinha Sequências de domínio leve variável. Asteriscos indicam as diferenças entre F(ab)-12 humanizada e o MAb de murino ou entre F(ab)-12 e a estrutura humana. As Regiões de Determinação de Complementaridade (CDRs) são sublinhadas.

[0017] A Figura 2 é um diagrama de fita do modelo de domínios VL e VH F(ab)-12 humanizado. O domínio VL é mostrado em marrom com CDRs em bronzeado. A cadeia lateral de resíduo L46 é mostrada em amarelo. O domínio VH é mostrado em púrpura com CDRs em cor-de-rosa. As cadeias laterais de resíduos VH alteradas de humano para murino são mostradas em amarelo.

[0018] A Figura 3 representa inibição de mitogênese induzida por VEGF por F(ab)-12 anti-VEGF humanizado de Exemplo 1. As células endoteliais capilares derivadas de córtex adrenal bovino foram semeadas em uma densidade de  $6 \times 10^3$  células/poço em seis placas de poço, conforme descrito no Exemplo 1. Igualmente o muMAb VEGF A.4.6.1 ou rhuMAb VEGF (IgG1; F(ab)-12) foi adicionado às concentrações indicadas. Após duas a 3 horas, rhVEGF165 foi adicionado na concentração final de 3 ng/ml. Após cinco ou seis dias, células foram tripsinizadas e contadas. Valores mostrados são meios de determinações duplicadas. A variação do método não excedeu 10%.

[0019] Figura 4 exibe a inibição de crescimento de tumor *in vivo* por F(ab)-12 anti-VEGF humanizado de Exemplo 1. As células de rhabdomicosarcoma A673 foram injetadas em camundongos nu BALB/c na densidade de  $2 \times 10^6$  por camundongo. Iniciando 24 horas após a inoculação de célula tumorais, animais foram injetados com um controle MAb, muMAb VEGF A4.6.1 ou rhuVEGF MAb (IgG1; F(ab)-12) duas vezes semanalmente, intra peritonealmente. A dose do Mab de controle foi de 5 mg/kg; o MAbs anti-VEGF foi dado a 0,5 ou 5 mg/kg, como indicado ( $n = 10$ ). Quatro semanas após injeção de células tumorais, animais foram eutanizados e tumores foram removidos e pesados. \*: significante diferença quando comparados ao grupo de controle por ANOVA ( $p < 0,05$ ).

[0020] As Figuras 5A e 5B exibem as Sequências de ácido dos domínios variáveis pesados respectivamente de anticorpos de murino A4.6.1 (SEQ ID NO:10 para a VL e SEQ ID NO:9 para o VH) e hu2.0 variantes A4.6.1 humanizados (SEQ

ID NO: 13 para o VL SEQ ID NO: 14 para o VH) e hu2.10 (SEQ ID NO: 15 para o VL e SEQ ID NO: 16 para o VH) do Exemplo 2. Numeração de Sequência é de acordo com Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Edição Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) e más combinações são indicadas por asteriscos (murino A4.6.1 vs hu2.0) ou projéteis (hu2 vs hu2.10). hu2.0 variante contém apenas as Sequências CDR (negrito) do anticorpo de murino enxertado sobre uma estrutura de consenso de subgrupo I k de cadeia leve humana (SEQ ID NO: 12) e estrutura de consenso de subgrupo III de cadeia pesada (SEQ ID NO: 11). hu2.10 foi o clone humanizado de consenso obtido de experiências do tipo fago descritas aqui.

[0021] A Figura 6 representa resíduos de estruturas alvejados para randomização no Exemplo 2.

[0022] A Figura 7 representa a construção fagêmica para a demonstração de superfície de fusões Fab-pIII em fago. O fagemida codifica uma versão humanizada do fragmento Fab para anticorpo A4.6.1 fundido em uma porção da proteína de revestimento de gene III M13. A proteína de fusão consiste no Fab ligado à extremidade carboxila da cadeia pesada a um resíduo único de glutamina (de supressão de um códon amber em *supE E. coli*), então a região de extremidade C da proteína de gene III (resíduos 249 a 406). A transformação em F<sup>+</sup> *E. coli*, seguida por superinfecção com o fago auxiliar M13KO7, produz partículas de fagêmida na qual uma pequena proporção destas exibe uma única cópia da proteína de fusão.

[0023] As Figuras 8A - E representam Sequência de nucleótido de trançamento duplo (SEQ ID NO: 99) para pHMB4-19-1.6 de vetor de anticorpo de exibição de fago no Exemplo 3 e a Sequência de aminoácido desse modo codificada (SEQ ID NO: 100).

[0024] As Figuras 9A e 9B representam um alinhamento das Sequências

aminoácidas para os domínios variáveis leves e pesados respectivamente de variantes anti-VEGF de afinidade amadurecida no Exemplo 3, comparado ao F(ab)-12 de Exemplo 1 (SEQ ID NO's 8 e 7 para domínios variáveis leves e pesados, respectivamente). Os CDRs são sublinhados e designados por cadeia L, leve, ou H, pesada, e os números 1 a 3. Os resíduos são numerados seqüencialmente nos domínios VL e VH, quando opostos ao esquema de numeração Kabat. A molécula padrão, MB 1,6 (SEQ ID NO's 101 e 102 para domínios variáveis leves e pesados, respectivamente) é mostrada, junto com variantes: H2305,6 (SEQ ID NO's 103 e 104 para domínios variáveis leves e pesados, respectivamente), Y0101 (SEQ ID NO's 105 e 106 para domínios variáveis leves e pesados, respectivamente), e Y0192 (SEQ ID NO's 107 e 108 para domínios variáveis leves e pesados, respectivamente). Diferenças de F(ab)-12 são mostradas em caixas sombreadas.

[0025] As Figuras 10A e 10B representam um alinhamento das Sequências aminoácidas para os domínios leves e pesados respectivamente de variantes anti-VEGF de afinidade amadurecida de Exemplo 3 comparado a F(ab)-12 de Exemplo 1 (SEQ ID NO's 8 e 7 para domínios variáveis leves e pesados, respectivamente). Os CDRs são sublinhados e designados por cadeia L, leve, ou H, pesada, e numerados de 1 a 3. As variantes são designadas Y0243-1 (SEQ ID NO's 109 e 110 para domínios leves e pesados, respectivamente), Y0238-3 (SEQ ID NO's 111 e 112 para os domínios leves e pesados, respectivamente), Y0313-1 (SEQ ID NO's 113 e 114 para domínios leves e pesados, respectivamente), e Y0317 (SEQ ID NO's 115 e 116 para domínios leves e pesados, respectivamente). Diferenças de F(ab)-12 são mostradas em caixas sombreadas.

[0026] A Figura 11 representa os resultados do teste de atividade HuVEC no Exemplo 3 para as variantes Y0238-3, Y0192 e Y0313-1 bem como F(ab)-12 de comprimento natural do Exemplo 1.

[0027] A Figura 12 representa a inibição de mitogênese induzida por VEGF

por F(ab)-12 de comprimento natural de Exemplo 1 (VEGF rhuMAb), um fragmento Fab de F(ab)-12 de Exemplo 1 (VEGF rhuFab), e um fragmento Fab de Y0317 de variante de afinidade amadurecida de Exemplo 3 (VEGF rhuFab (afinidade amadurecida)).

#### DESCRÍÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

##### Definições

[0028] O termo “VEGF humano” quando empregado aqui refere-se ao fator de crescimento de célula endotelial vascular humana do aminoácido 165, e fatores de crescimento de célula endotelial vascular de aminoácido 121, 189 e 206 relacionados, conforme descrito por Leung e outros. *Science* 246: 1306 (1989), e Houck e outros, *Mol. Endocrin.* 5: 1806 (1991) junto com as formas alélicas e processadas de ocorrência natural daqueles fatores de crescimento.

[0029] A presente invenção fornece anticorpos antagonísticos anti-VEGF que são capazes de inibir uma ou mais das atividades biológicas de VEGF, por exemplo, sua atividade mitogênica ou angiogênica. Os antagonistas de VEGF atua interferindo com a ligação de VEGF com um receptor celular, incapacitando ou matando células que foram ativadas por VEGF, ou interferindo com ativação de célula endotelial vascular após ligação VEGF a um receptor celular. Todos os tais pontos de intervenção por um antagonista de VEGF devem ser considerados equivalentes para os propósitos desta invenção.

[0030] O termo “receptor VEGF” ou “VEGFr” como aqui empregado refere-se a um receptor celular para VEGF, ordinariamente um receptor de superfície celular encontrado em células endoteliais vasculares, bem como suas variantes que retêm a capacidade de ligar hVEGF. Um exemplo de um receptor VEGF é a quinase de tirosina tipo *fms* (*flt*), um receptor de transmembrana na família quinase de tirosina. DeVries e outros, *Science* 255: 989 (1992); Shibuya e outros, *Oncogene* 5: 519 (1990). O receptor *flt* compreende um domínio extracelular,

um domínio de transmembrana, e um domínio intracelular com atividade de quinase de tirosina. O domínio extracelular é envolvido na ligação de VEGF, ao passo que o domínio intracelular é envolvido em transdução de sinal. Outro exemplo de um receptor VEGF é o receptor *f/k-1* (também referido como KDR). Matthews e outros, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:9026 (1991); Terman e outros *Oncogene* 6: 1677 (1991); Terman e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1579 (1992). A ligação de VEGF ao receptor *f/k* resulta na formação de pelo menos dois complexos de peso molecular elevado, tendo peso molecular aparente de 205.000 e 300.000 Dáltons. O complexo de 30.000 dáltons acredita-se ser um dímero compreendendo duas moléculas receptoras ligadas a uma molécula única de VEGF.

[0031] O termo “epítopo A4.6.1” quando aqui empregado, a menos que de outra maneira indicada, refere-se à região de VEGF humano ao qual o anticorpo A4.6.1 descrito em Kim e outros, *Growth Factors* 7:53 (1992) e Kim e outros *Nature* 362: 841 (1993) liga-se.

[0032] “Tratamento” refere-se a igualmente tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles já com o distúrbio bem como aqueles nos quais o distúrbio deve ser prevenido.

[0033] “Mamífero” para os propósitos de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de fazenda, e animais de zoológico, esportes, ou de estimação, tal como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. Preferivelmente, o mamífero é humano.

[0034] “Anticorpos” (Abs) e “imunoglobulinas” (Igs) são glicoproteínas tendo as mesmas características estruturais. Ao mesmo tempo que os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antígeno específico, imunoglobulinas incluem ambos anticorpos e outras moléculas tipo anticorpo que necessitam de

especificidade de antígeno. Os polipeptídeos do último tipo são, por exemplo, produzidos em baixos níveis pelo sistema de linfa e em níveis aumentados por mielomas.

[0035] “Anticorpos nativos” e “imunoglobulinas nativas” são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 dáltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação de dissulfeto covalente, ao mesmo tempo que o número de ligações de dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve também tem ligações em ponte de dissulfeto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem, em uma extremidade, um domínio variável ( $V_H$ ) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade ( $V_L$ ) e um domínio constante em sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que os resíduos de aminoácidos particulares formem uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e pesada.

[0036] O termo “variável” refere-se ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente em Sequência entre anticorpos e são empregados na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. Entretanto, a variabilidade é não uniformemente distribuída através dos domínios variáveis de anticorpos. É concentrado em três segmentos chamados regiões hipervariáveis ambos os domínios variáveis de cadeia leve e cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas as regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis de cadeias na-

tivas pesadas e leves, cada compreende quatro FRs (FR1, FR2, FR3 e FR4, respectivamente), largamente adotando uma configuração de folha  $\beta$ , conectada por três regiões hipervariáveis, que formam loops conectando, e em alguns casos tomando parte da estrutura de folha  $\beta$ . As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas juntas em proximidade íntima pelos FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno de anticorpos (veja Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Edição Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), páginas 647 a 669). Os domínios constantes não são envolvidos diretamente ligando um anticorpo a um antígeno, porém exibe várias funções efetoras, tal como participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpo.

[0037] O termo “região hipervariável” quando empregado aqui refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma “região de determinação de complementariedade” ou “CDR” (isto é, resíduos 24 - 34 (L1), 50 - 56 (L2) e 89 - 97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31 - 35 (H1), 50 - 65 (H2) e 95 - 102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat e outros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Edição Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um “loop hipervariável” (isto é, resíduos 26 - 32 (L1), 50 - 52 (L2) e 91 - 96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26 - 32 (H1), 53 - 55 (H2) e 96 - 101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901 a 917 (1987)). Resíduos de “Estrutura” ou “FR” são aqueles resíduos de domínio variável diferentes dos resíduos de região hipervariável como aqui definido.

[0038] Digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação a antígeno idênticos, chamados fragmentos “Fab”, cada com um sítio de ligação de antígeno único, e um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete sua capacidade de facilmente cristalizar. O tratamento de pepsina produz um fragmento  $F(ab')_2$  que tem dois sítios combinando antígeno e é ainda capaz de reticular antígeno.

[0039] “Fv” é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento de antígeno e de ligação de antígeno completo. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em associação não-covalente, estreita. É nesta configuração que as três regiões hipervariáveis de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação a antígeno sobre a superfície do dímero  $V_H - V_L$ . Coletivamente, as seis regiões hipervariáveis conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo apenas três regiões hipervariáveis específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em uma afinidade inferior ao sítio de ligação inteiro.

[0040] O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem de fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos na extremidade carboxila do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo ums ou mais cisteína(s) da região de articulação de anticorpo. Fab's-SH é a designação aqui para Fab' na qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes suportam um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo  $F(ab')_2$  originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas articulares entre elas. Outros pares químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos.

[0041] As “cadeias leves” de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser designadas para um dos dois tipos claramente distintos, chamados kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), com base nas Sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

[0042] Dependendo da Sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser designadas para classes diferentes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, e diversos destes podem ser ainda divididos em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamadas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respectivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de classes diferentes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

[0043] O termo “anticorpo” aqui é empregado no sentido mais amplo e especificamente abrange anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento natural), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos bi-específicos), e fragmentos de anticorpo contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

[0044] “Fragmentos de anticorpo” compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento natural, geralmente a ligação de antígeno ou domínio variável destes. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, e fragmentos Fv; diacorpos (“diabodies”); anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo.

[0045] O termo “anticorpo monoclonal” como aqui empregado refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homo-

gêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto para possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste com preparações de anticorpo (policlonal) convencional que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. O “monoclonal” modificador indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser construído como requerendo produção do anticorpo de qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser preparados pelo método hibridoma primeiramente descrito por Kohler e outros, *Nature* 256: 495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de DNA recombinantes (veja, por exemplo, a Patente U. S. nº 4.816.567). Os “anticorpos monoclonais” podem ser também isolados de bibliotecas de anticorpo de fago empregando as técnicas descritas em Clackson e outros, *Nature* 352: 624 a 628 (1991) e Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222: 581 - 597 (1991), por exemplo.

[0046] Os anticorpos monoclonais aqui especificamente incluem anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou cadeia leve é idêntica com ou homóloga a Sequências correspondentes em anticorpos derivados de espécies particulares ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, ao mesmo tempo que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico com ou homólogo a Sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente U. S. nº 4.816.567; e Morrison e outros,

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851 a 6855 (1984)).

[0047] As formas “humanizadas” de anticorpos não-humanos (por exemplo, murino) são anticorpos químéricos que contêm Sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nos quais resíduos de região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não-humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos de região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para ainda definir o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos das regiões hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não-humana e todos ou substancialmente todos dos FRs são aqueles de uma Sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para maiores detalhes, veja Jones e outros, *Nature* 321: 522 - 525 (1986); Reichmann e outros, *Nature* 332: 323 a 329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 a 596 (1992).

[0048] Os fragmentos de anticorpo “Fv de cadeia única” ou “sFv” compreendem os domínios  $V_H$  e  $V_L$  de anticorpo, onde estes domínios estão presentes em uma cadeia de polipeptídeo única. Geralmente, o polipeptídeo Fv ainda compreende um ligador de polipeptídeo entre os domínios  $V_H$  e  $V_L$  que possibilita o

sFv formar a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão de sFv veja Pluckthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg e Moore edição Springer-Verlag, New York, pp. 269 a 315 (1994).

[0049] O termo “*diabodies*” refere-se a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada ( $V_H$ ) conectado a um domínio variável de cadeia leve ( $V_L$ ) na mesma cadeia de polipeptídeo ( $V_H - V_L$ ). Empregando-se um ligador que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia para criar dois sítios de ligação de antígeno. “*Diabodies*” são descritos mais completamente em, por exemplo, EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444 a 6448 (1993).

[0050] A expressão “anticorpos lineares” quando empregada em todo este pedido refere-se aos anticorpos descritos em Zapata e outros. *Protein Eng.* 8(10): 1057 - 1062 (1995). Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos Fd tandem ( $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ ) que formam um par de regiões de ligação de antígeno. Os anticorpos lineares podem ser bi-específicos ou mono-específicos.

[0051] Um anticorpo anti-VEGF “variante”, refere-se aqui a uma molécula que difere em Sequência de aminoácido de uma Sequência de aminoácido de anticorpo anti-VEGF “origem” em virtude de adição, deleção e/ou substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na Sequência de anticorpo parental. Na modalidade preferida, a variante comprehende uma ou mais substituição(es) em uma ou mais região(es) hipervariável(veis) do anticorpo parental. Por exemplo, a variante pode compreender pelo menos uma, por exemplo de cerca de uma a cerca de dez, e preferivelmente de cerca de duas a cerca de cinco, substituições em uma ou mais regiões hipervariáveis do anticorpo parental. Ordinariamente,

a variante terá uma Sequência aminoácida tendo pelo menos 75% de identidade de Sequência aminoácida com as Sequências de domínio variável de cadeia pesada ou leve de anticorpo parental (por exemplo como na SEQ ID NO:7 ou 8), mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e mais preferivelmente pelo menos 95%. A identidade ou homologia com respeito a esta Sequência é definida aqui como a percentagem de resíduos de aminoácidos na Sequência candidado que são idênticos com os resíduos de anticorpo parental, após o alinhamento das Sequências e introdução de lacunas, se necessário, para obter a identidade de Sequência de percentual máximo. Nenhuma das extensões de extremidade N, extremidade C ou interna, deleções ou inserções na Sequência de anticorpo deve ser construída quando afetando a identidade ou homologia de Sequência. A variante retém a capacidade de ligar VEGF humano e preferivelmente tem propriedades que são superiores àquelas do anticorpo parental. Por exemplo, a variante pode ter uma afinidade de ligação mais forte, capacidade realçada para inibir a proliferação induzida por VEGF das células endoteliais e/ou capacidade aumentada para inibir angiogênese induzida por VEGF *in vivo*. Para analisar tais propriedades, alguém deve comparar uma forma Fab da variante a uma forma Fab do anticorpo parental ou uma forma de comprimento natural da variante a uma forma de comprimento natural do anticorpo parental, por exemplo, uma vez que constatou-se que o formato do anticorpo anti-VEGF impacta sua atividade nos testes de atividade biológica aqui descritos. O anticorpo variante de particular interesse aqui é aquele que exibe pelo menos cerca de 10 vezes, preferivelmente pelo menos cerca de 20 vezes, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 50 vezes, realce em atividade biológica quando comparado ao anticorpo parental.

[0052] O anticorpo “origem” aqui é um que é codificado por uma Sequência de aminoácido empregada para a preparação da variante. Preferivelmente, o anticorpo parental tem uma região de estrutura humana e, se presente, tem região(ões) constante(s) de anticorpo humano. Por exemplo, o anticorpo parental pode ser o anticorpo humanizado ou humano.

[0053] Um anticorpo “isolado” é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Os componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interfeririam com os empregos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros proteináceos ou não-proteináceos solutos. Em modalidades preferidas, o anticorpo será purificado (1) para mais do que 95% em peso de anticorpo conforme determinado pelo método Lowry, e mais preferivelmente mais do que 99% em peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de Sequência aminoácida N-terminal ou interna pelo emprego de um seqüenciador “spinning cup” ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução empregando azul Coomassie ou, preferivelmente, mancha de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Ordinariamente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

[0054] O termo “epítopo alvejado” quando aqui empregado refere-se ao anticorpo anti-VEGF fundido a um “epítopo alvo”. O polipeptídeo de epítopo alvo tem resíduos suficientes para fornecer um epítopo contra o qual um anticorpo contrário pode ser preparado, ainda é curto o suficiente tal que não interfira com a atividade do anticorpo VEGF. O epítopo alvo preferivelmente é suficientemente único a fim de que o anticorpo contrário não substancialmente reaja

de forma cruzada com outros epítópos. Adequados polipeptídeos alvo geralmente têm pelo menos 6 resíduos de aminoácidos e usualmente entre cerca de 8 - 50 resíduos de aminoácidos (preferivelmente entre cerca de 9 a 30 resíduos). Exemplos incluem o polipeptídeo alvo flu HA e seu anticorpo 12CA5 (Field e outros *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159 - 2165 (1988)); o c-myc alvo e o 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 anticorpos destes (Evan e outros, *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3610 - 3616 (1985)); e a glicoproteína de vírus de Herpes Simplex D(gD) alvo e seu anticorpo (Paborsky e outros, *Protein Engineering* 3(6): 547 - 553 (1990)). Em certas modalidades, o epítopo alvo é um “epítopo de ligação de receptor de recuperação”. Como aqui empregado, o termo “epítopo de ligação de receptor de recuperação” refere-se a um epítopo da região Fo de uma molécula IgG (por exemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, ou IgG<sub>4</sub>) que é responsável por aumento da meia vida do soro *in vivo* da molécula IgG.

[0055] O termo “agente citotóxico” como aqui empregado refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa a destruição de células. O termo é destinado a incluir isótopos radioativos (por exemplo I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup> e Re<sup>186</sup>), agentes quimioterapêuticos, e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas parental bacteriana, fúngica, planta ou animal, ou os fragmentos destas.

[0056] Um “agente quimioterapêutico” é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem Adriamicina, Doxorubicina, 5-Fluorouracila, Arabinosídeo de citosina (“Ara-C”), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotero (docetaxel), Bussulfam, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalam, Vinblastina, Bleomicina, Etoposídeo, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincreistina, Vinorelbina, Carboplatina, teniposídeo, Dau-nomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esper-

micinas (veja a Patente U. S. nº 4.675.187), Melfalam e outras mostardas de nitrogênio relacionadas.

[0057] O termo “pró-droga” como empregado neste pedido refere-se a uma forma precursora ou derivada de uma substância farmaceuticamente ativa que é menos citotóxica para células tumorais comparada à droga parental e é capaz de ser enzimaticamente ativada e convertida na mais ativa forma parental. Veja, por exemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375 a 382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella e outros, “Pro-drugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, *Directed Drug Delivery*, Borchardt e outros, (ed.), pp. 247 - 267, Humana Press (1985). As pró-drogas desta invenção incluem, porém não estão limitadas a, pró-drogas contendo fosfato, pró-drogas contendo tiofosfato, pró-drogas contendo sulfato, pró-drogas contendo peptídeo, pró-drogas modificadas por aminoácido D, pró-drogas glicosiladas, pró-drogas contendo β-lactama, pró-drogas contendo fenacetamida opcionalmente substituída ou pró-drogas contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outras pró-drogas de 5-fluorouridina, que podem ser convertidas na droga livre de citotóxico mais ativa. Exemplos de drogas citotóxicas que podem ser derivatizadas em uma forma de pró-droga para uso nesta invenção incluem, porém não são limitadas àqueles agentes quimioterapêuticos descritos acima.

[0058] A palavra “rótulo” quando aqui empregado refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugado diretamente ou indiretamente ao anticorpo. O rótulo pode por si próprio ser detectável (por exemplo, rótulos radioisótopos ou rótulos fluorescentes) ou, no caso de um rótulo enzimático, pode catalisar alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável.

[0059] Por “fase sólida” entende-se uma matriz não-aquosa à qual o anti-corpo da presente invenção pode aderir. Exemplos de fases sólidas abrangidas aqui incluem aquelas formadas parcialmente ou totalmente de vidro (por exemplo vidro de poro controlado), polissacarídeos (por exemplo, agarose), poliacrilamidas, poliestireno, álcool polivinílico e silicones. Em certas modalidades, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender o manancial de uma placa de ensaio; em outras é uma coluna de purificação (por exemplo uma coluna de cromatografia de afinidade). Este termo também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como aquelas descritas na Patente U. S. nº 4.275.149.

[0060] Um “lipossoma” é uma vesícula pequena composta de vários tipos e lipídeos, fosfolipídeos e/ou tensoativo que é útil para liberação de uma droga (tal como os anticorpos anti-VEGF aqui descritos e, opcionalmente, um agente quimioterapêutico) para um mamífero. Os componentes do lipossoma são comumente dispostos em uma formação de bicamada, similar à disposição de lipídeo de membranas biológicas. Uma molécula de ácido nucléico “isolada” é uma molécula de ácido nucléico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucléico contaminante com a qual ela está ordinariamente associada na fonte natural do ácido nucléico de anticorpo. Uma molécula de ácido nucléico isolada é diferente da forma ou fixação em que ela é encontrada ao natural. As moléculas de ácido nucléico isoladas, portanto, são distinguidas da molécula de ácido nucléico como ela existe nas células naturais. Entretanto, uma molécula de ácido nucléico inclui uma molécula de ácido nucléico contida em células que ordinariamente expressam o anticorpo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucléico está em uma localização cromossomal diferente daquela de células naturais.

[0061] A expressão “Sequências de controle” refere-se a Sequências DNA

necessárias para a expressão de uma Sequência de codificação operavelmente ligada em um organismo hospedeiro particular. As Sequências de controle que são adequadas para procariotes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma Sequência operadora, e um sítio de ligação de ribossoma. As células eucarióticas são conhecidas utilizar promotores, sinais de poliadenilação, e realçadores.

[0062] O ácido nucléico é “operavelmente ligado” quando é colocado em uma conexão com outra Sequência de ácido nucléico. Por exemplo, DNA para uma pré-Sequência ou líder secretor é operavelmente ligado a DNA para um polipeptídeo se ele é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou realçador é operavelmente ligado a uma Sequência de codificação se ele afeta a transcrição da Sequência; ou um sítio de ligação de ribossoma é operavelmente ligado a uma Sequência de codificação se ele está posicionado a fim de facilitar a translação. Geralmente, “operavelmente ligado” significa que as Sequências de DNA sendo ligadas são contíguas, e, no caso de um líder secretor, contíguas e em fase de leitura. Entretanto, os realçadores não devem ser contíguos. A ligação é executada por ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os adaptadores ou ligadores de oligonucleotídeo sintético são empregados de acordo com a prática convencional.

[0063] Como aqui empregado, as expressões “células”, “linhagem celular”, e “cultura celular” são empregadas intercambiavelmente e todas as tais designações incluem progénie. Dessa maneira, as palavras “transformantes” e “células transformadas” incluem a célula objeto primária e culturas derivadas dela sem consideração do número de transferidores. Entende-se também que toda progénie pode não ser precisamente idêntica em conteúdo de DNA, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. A progénie mutante que tem a mesma

função ou atividade biológica quando analisada quanto às células originalmente transformadas é incluída. Onde as designações distintas são pretendidas, será claro para o contexto.

#### Modos para Execução da Invenção

[0064] Os exemplos a seguir descritos na produção de anticorpos anti-VEGF humanizados e variantes com propriedades desagradáveis para uma perspectiva terapêutica incluindo: (a) forte afinidade de ligação para o antígeno VEGF; (b) uma capacidade para inibir a proliferação induzida por VEGF de células endoteliais *in vitro*; (c) a capacidade para inibir angiogênese induzida por VEGF *in vivo*.

[0065] As afinidades de anticorpos podem ser determinadas conforme descrito nos exemplos a seguir. Os anticorpos humanizados ou variantes preferidos são aqueles que ligam VEGF humano com um valor  $K_d$  de não mais do que cerca de  $1 \times 10^{-7} M$ ; preferivelmente não mais do que cerca de  $1 \times 10^{-8} M$ ; e mais preferivelmente não mais do que cerca de  $5 \times 10^{-9} M$ .

[0066] Com exceção dos anticorpos com forte afinidade de ligação para VEGF humano, é também desejável selecionar-se anticorpos humanizados ou variantes que têm outras propriedades benéficas de uma perspectiva terapêutica. Por exemplo, o anticorpo pode ser um que iniba o crescimento de célula endotelial em resposta ao VEGF. Em uma modalidade, o anticorpo pode ser capaz de inibir proliferação de célula endotelial capilar bovina em resposta a uma concentração íntima maximamente eficaz de VEGF (3 ng/ml). Preferivelmente, o anticorpo tem um valor de 50 (ED<sub>50</sub>) de dose eficaz de não mais do que cerca de 5 nM, preferivelmente não mais do que cerca de 1 nM, e mais preferivelmente não mais do que cerca de 0,5 nM, para inibição da proliferação induzida por VEGF de células endoteliais neste “ensaio de crescimento de célula endotelial”, isto é, nestas concentrações o anticorpo é capaz de inibir o crescimento de célula

endotelial induzida por VEGF *in vitro* em 50%. Um “teste de crescimento de célula endotelial” preferido envolve cultivar células endoteliais capilares derivadas de córtex adrenal bovino na presença de baixo meio de Eagle’s modificado de Dulbecco’s de glicose (DMEM) (GIBCO) suplementado com 10% de soro de bezerro, 2 mM de glutamina, e antibióticos (veículo de crescimento), essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 abaixo. Estas células endoteliais são semeadas em uma densidade de  $6 \times 10^3$  por fonte, em 6 placas de poço em meio de crescimento. Qualquer dos dois anticorpos anti-VEGF parental (controle), anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante é então adicionado em concentrações variando entre 1 e 5000 ng/ml. Após duas a 3 horas, o VEGF purificado foi adicionado a uma concentração final de 3 ng/ml. Para o controle de especificidade, cada anticorpo pode ser adicionado a células endoteliais na concentração de 5000 ng/ml, ou sozinho ou na presença de 2 ng/ml bFGF. Após cinco ou seis dias, células são dissociadas por exposição à tripsina e contadas em um registrador Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Dados podem ser analisados por um programa de ajustamento de curva de quatro parâmetros (KaleidaGraph).

[0067] O anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante preferido pode também ser um que tem atividade de supressão de tumor *in vivo*. Por exemplo, o anticorpo pode suprimir o crescimento de células de rhabdomiossarcoma A673 humanas ou células de carcinoma de mama MDA-MB-435 em camundongo nu. Para estudos de tumor *in vivo*, as células de rhabdomiossarcoma A673 humanas (ATCC; CRL 1598) ou células MDA-MB-435 (disponível do ATCC) são cultivadas em DMEM/F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina e antibióticos conforme descrito no Exemplo 1 abaixo. Camundongo nu BALB/c fêmea, de 6 a 10 semanas de idade, são injetados subcutaneamente com  $2 \times 10^6$  células tumorais na área dorsal em um volume de 200 µl. Animais são então tratados com o anticorpo humanizado ou variante e um anticorpo de controle com

nenhuma atividade neste teste. O MAb anti-VEGF humanizado ou variante é administrado em uma dose de 0,5 e/ou 5 mg/kg. Cada MAb é administrado duas vezes semanalmente intra-peritonealmente em um volume de 100 µl, iniciando 24 horas após a inoculação de célula tumoral. O tamanho do tumor é determinado em intervalos semanais. Quatro semanas após a inoculação de célula tumoral, animais são eutanizados e os tumores são removidos e pesados. A análise estatística pode ser executada por ANOVA. Preferivelmente, o anticorpo neste “ensaio de tumor *in vivo*” inibe cerca de 50 a 100%, preferivelmente cerca de 70 a 100% e mais preferivelmente cerca de 80 a 100% de crescimento de célula tumoral A673 humana em um dose de 5 mg/kg.

[0068] Na modalidade preferida, o anticorpo humanizado ou variante não deixa de extrair uma resposta imunogênica na administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo em um paciente humano. Se uma resposta imunogênica é extraída, preferivelmente a resposta será tal que o anticorpo ainda forneça um benefício terapêutico ao paciente tratado com ele.

[0069] O anticorpo humanizado ou variante é também preferivelmente um que seja capaz de inibir angiogênese induzida por VEGF, por exemplo, para inibir crescimento de tumor humano e/ou inibir angiogênese intraocular em distúrbios retinais.

[0070] Os anticorpos preferidos ligam o “epítopo A4.6.1” conforme aqui definido. Para selecionar anticorpos que se ligam ao epítopo em ligação de VEGF humano por um anticorpo de interesse (por exemplo, aqueles que bloqueiam ligação do anticorpo A4.6.1 ao VEGF humano), um ensaio de bloqueio transversal de rotina tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Edição Harlow e David Lane (1988), pode ser executado. Alternativamente, o mapeamento de epítopo, por exemplo, conforme des-

crito em Champe e outros, *J. Biol. Chem.* 270: 1388 a 1394 (1995), pode ser executado para determinar se o anticorpo liga um epítopo de interesse.

[0071] Os anticorpos da modalidade preferida aqui têm um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma Sequência de aminoácido representada pela fórmula: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4, onde “FR1-4” representa as quatro regiões de estrutura e “CDRH1-3” representa as três regiões hipervariáveis de um domínio pesado variável de anticorpo anti-VEGF. FR1-4 pode ser derivado de uma “Sequência de consenso” (isto é os aminoácidos mais comuns de uma classe, subclasse ou subgrupo de cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas humanas) como nos exemplos abaixo ou pode ser derivado de uma região de estrutura de anticorpo humano individual ou de uma combinação de Sequências diferentes de região de estrutura. Muitas Sequências de região de estrutura de anticorpo humano são compiladas em Kabat e outros, supra, por exemplo. Em uma modalidade preferida, o FR pesado variável é fornecido por uma Sequência de consenso de um subgrupo de imunoglobulina humana conforme compilado por Kabat e outros, supra. Preferivelmente, o subgrupo de imunoglobulina humana é subgrupo III de cadeias pesadas humanas (por exemplo na SEQ ID NO: 11).

[0072] A Sequência FR pesada variável humana preferivelmente tem aqui substituições, por exemplo onde o resíduo FR humano é substituído por um resíduo não-humano correspondente (por “resíduo não-humano correspondente” entende-se o resíduo não-humano com a mesma numeração posicional Kabat como o resíduo humano de interesse quando as Sequências humanas e não-humanas são alinhadas), porém a substituição com o resíduo não-humano não é necessária. Por exemplo, uma substituição de resíduo FR diferente do resíduo não-humano correspondente pode ser selecionada por exibição de fago (veja Exemplo 2 abaixo). Os resíduos FR pesados variáveis exemplares que podem ser

substituídos incluem qualquer um ou mais dos números de resíduo FR: 37H, 49H, 67H, 69H, 71H, 73H, 75H, 76H, 78H, 94H (numeração de resíduo Kabat empregada aqui). Preferivelmente pelo menos dois, ou pelo menos três, ou pelo menos quatro destes resíduos são substituídos. Uma combinação particularmente preferida de substituições FR é: 49H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H e 94H.

[0073] Com respeito às regiões hipervariáveis de cadeia pesada, estas têm preferivelmente Sequências aminoácidas como segue:

#### CDRH1

[0074] GYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>YGX<sub>5</sub>N (SEQ ID NO: 117), onde X<sub>1</sub> é D, T ou E, porém preferivelmente é D ou T; X<sub>2</sub> é F, W ou Y, porém preferivelmente é F; X<sub>3</sub> é T, Q, G ou S, porém preferivelmente é T; X<sub>4</sub> é H ou N; e X<sub>5</sub> é M ou I, porém preferivelmente é M.

#### CDRH2

[0075] WINTX<sub>1</sub>TGEPTYAADFKR (SEQ ID NO: 118), onde X<sub>1</sub> é Y ou W, porém preferivelmente é Y.

#### CDRH3

[0076] YPX<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>HWYFDV (SEQ ID NO: 119), onde X<sub>1</sub> é H ou Y; X<sub>2</sub> é Y, R, K, I, T, E, ou W, porém preferivelmente é Y; X<sub>3</sub> é G, N, A, d, Q, E, T, K, ou S, porém preferivelmente é G; X<sub>4</sub> é S, T, K, Q, N, R, A, E, ou G, porém preferivelmente é S ou T; e X<sub>5</sub> é S ou G, porém preferivelmente é S.

[0077] O domínio variável de cadeia pesada opcionalmente compreende o que foi designado “CDR7” anexo a (isto é, tomando parte de) FR3 (veja as Figuras 9B e 10B), onde CDR7 pode ter a seguinte Sequência aminoácida:

#### CDR7

[0078] X<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>DX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>TX<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 120), onde X<sub>1</sub> é F, I, V, L, ou A, porém preferivelmente é F; X<sub>2</sub> é A, L, V, ou I, porém preferivelmente é L; X<sub>3</sub> é T, V ou K, porém preferivelmente é T; X<sub>4</sub> é S ou W, porém preferivelmente é S; X<sub>5</sub> é S ou K,

porém preferivelmente é K; X<sub>6</sub> é N, ou S, porém preferivelmente é S; e X<sub>7</sub> é V, A, L ou I, porém preferivelmente é A.

[0079] Os anticorpos da modalidade preferida aqui têm um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma Sequência aminoácida representada pela fórmula; FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4, onde “FR1-4” representa as quatro regiões de estrutura e “CDRL1-3” representa as três regiões hipervariáveis de um domínio pesado variável de anticorpo anti-VEGF. O FR1-4 pode ser derivado de uma “Sequência de consenso” (isto é, os aminoácidos mais comuns de uma classe, subclasse ou subgrupo de cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas humanas) como nos exemplos abaixo ou pode ser derivado de uma região de estrutura de anticorpo humano individual ou de uma combinação de Sequências diferentes de região de estrutura. Em uma modalidade preferida, o FR leve variável é fornecido por uma Sequência de consenso de um subgrupo de imunoglobulina humana como compilado por Kabat e outros, supra. Preferivelmente, o subgrupo de imunoglobulina humana é um subgrupo I de cadeia leve capa humana (por exemplo como na SEQ ID NO: 12).

[0080] A Sequência FR leve variável humana preferivelmente tem substituições aqui, por exemplo, onde o resíduo FR humano é substituído por um resíduo de camundongo correspondente, porém a substituição com o resíduo não-humano não é necessária. Por exemplo, um resíduo de substituição diferente do resíduo não-humano correspondente pode ser selecionado pela exibição de fago (veja Exemplo 2 abaixo). Os resíduos FR leves variáveis exemplares que podem ser substituídos incluem qualquer um ou mais dos resíduos FR números: 4L, 46L e 71L (numeração de resíduo Kabat empregada aqui). Preferivelmente apenas 46 L é substituído. Em outra modalidade, ambos 4L e 46l são substituídos.

[0081] Com respeito aos CDRs, estes preferivelmente têm Sequências de aminoácidos como segue:

## CDRL1

[0082] X<sub>1</sub>AX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>SNYLN (SEQ ID NO: 121), onde X<sub>1</sub> é R ou S, porém preferivelmente é S; X<sub>2</sub> é S ou N, porém preferivelmente é S; X<sub>3</sub> é Q ou E, porém preferivelmente é Q; X<sub>4</sub> é Q ou D, porém preferivelmente é D; e X<sub>5</sub> é I ou L, porém preferivelmente é I.

## CDRL2

[0083] FTSSLHS (SEQ ID NO: 122)

## CDRL3

[0084] QQYSX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>PWT (SEQ ID NO: 123), onde X<sub>1</sub> é T, A ou N, porém preferivelmente é T; e X<sub>2</sub> é V ou T, porém preferivelmente é V.

[0085] Os anticorpos anti-VEGF humanizados preferidos são aqueles tendo as Sequências de domínio variável pesadas e/ou leves de F(ab)-12 no Exemplo 1 e suas variantes tais como formas de afinidade amadurecida incluindo as variantes Y0317, SY0313-1 e Y0238-3 no Exemplo 3, com Y0317 sendo a variante preferida. Os métodos para geração de anticorpos anti-VEGF humanizados de interesse aqui são elaborados em maiores detalhes abaixo.

A. Preparação de Anticorpo

[0086] Os métodos para humanização de anticorpos VEGF não-humanos e geração de variantes de anticorpos anti-VEGF são descritos nos exemplos abaixo. A fim de humanizar um anticorpo anti-VEGF, o material de partida de anticorpo não-humano é preparado. Onde uma variante deve ser gerada, o anticorpo parental é preparado. As técnicas exemplares para geração de tal material de partida de anticorpo não-humano e anticorpos parentais serão descritas nas seguintes seções.

(i) Preparação de Antígeno

[0088] O antígeno VEGF a ser empregado para a produção de anticorpos pode ser, por exemplo, VEGF intacto ou um fragmento de VEGF (por exemplo,

um fragmento de VEGF compreendendo “epítopo A4.6.1”). Outras formas de VEGF úteis para a geração de anticorpos serão evidentes para aqueles versados na técnica. O antígeno VEGF empregado para gerar o anticorpo, é preferivelmente VEGF humano, por exemplo, conforme descrito em Leung e outros, *Science* 246: 1306 (1989), e Houck e outros, *Mol. Endocrin.* 5: 1806 (1991).

### *(ii) Anticorpos Polyclonais*

[0089] Os anticorpos polyclonais são preferivelmente aumentados em animais por injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) múltiplas do antígeno relevante e um auxiliar. Eles podem ser úteis para conjugar o antígeno relevante a uma proteína que é imunogênica nas espécies a serem imunizadas, por exemplo, hemocianina de lapa “Keyhole”, albumina de soro, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja empregando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de sulfos-sucinimida de maleimidobenzoíla (conjugação por meio de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina) glutaraldeído, anidreto sucínico,  $\text{SOCl}_2$ , ou  $\text{R}^1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$ , onde R e  $\text{R}^1$  são diferentes grupos alquila.

[0090] Animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados combinando-se, por exemplo, 100  $\mu\text{g}$  ou 5  $\mu\text{g}$  da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de auxiliar completo de Freund’s e injetando a solução intradermalmente em sítios múltiplos. Um mês mais tarde os animais são loopdos com 1/5 a 1/10 da quantidade original de peptídeo ou conjugados em auxiliar completo de Freund’s por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a 14 dias mais tarde os animais são sangrados e o soro é testado quanto ao titular de anticorpo. Os animais são loopdos até o platô título. Preferivelmente, o animal é loopdo com o conjugado do mesmo antígeno, porém conjugado a uma diferente proteína e/ou por meio de

um reagente de reticulação diferente. Os conjugados também podem ser preparados em cultura de célula recombinante como fusões de proteína. Também, agentes de agregação tais como alumínio são adequadamente empregados para realçar a resposta imune.

*(iii) Anticorpos Monoclonais*

[0091] Os anticorpos monoclonais podem ser preparados empregando-se o método hibridoma primeiramente descrito por Kohler e outros, *Nature*, 256; 495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de DNA recombinantes (Patente U. S. nº 4.816.567).

[0092] No método hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um *hamster* ou macaco símio, é imunizado como acima descrito para extrair linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que serão especificamente ligados à proteína empregada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos então são fundidos com células de mieloma empregando-se um adequado agente de fusão, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal antibodies; Principles and Practice*, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)).

[0093] As células de hibridoma dessa maneira preparadas são semeadas e desenvolvidas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parental não-fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parental necessitam da [enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT)], o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, e timidina (veículo HAT), cujas substâncias previnem o crescimento de células deficientes de HGPRT.

[0094] As células de mieloma preferidas são aquelas que eficientemente se

fundem, suportam produção de elevado nível estável de anticorpo pelas células de produção de anticorpo, selecionado e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Entre estas, as linhagens de célula de mieloma preferidas são linhagens de mieloma de murino, tal como aquelas derivadas de tumores de camundongo MOP-21 e M.C.-11 disponível do Salk Institute cell Distribution Center, San Diego, Califórnia USA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponível do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. As linhagens de célula de mieloma humano e de heteromieloma humano e camundongo também foram descritas quanto à produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur e outros, *Monoclonal antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0095] O meio de cultura no qual as células de hibridoma são desenvolvidas é testado quanto à produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um teste de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou teste de imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA).

[0096] A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise de Scatchard de Munson e outros, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

[0097] A seguir, as células de hibridoma são identificadas de modo que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade, os clones podem ser subclonados limitando-se os procedimentos de diluição e desenvolvimento pelos métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)). O meio de cultura adequado para este propósito inclui, por exemplo, o meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células

de hibridoma podem ser desenvolvidas *in vivo* como tumores ascites em um animal.

[0098] Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascites, ou soro pelos procedimentos de purificação de imunoglobulina convencional tal como, por exemplo, Sefarose de proteína A, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, dialise, ou cromatografia de afinidade.

[0099] O DNA codificando os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e seqüenciado empregando-se procedimentos convencionais (por exemplo, empregando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfetados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outra maneira não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A produção de anticorpos recombinantes será descrita em maiores detalhes abaixo.

*(iv) Variantes de Sequência de humanização e aminoácido*

[00100] Os exemplos 1 - 2 abaixo descrevem procedimentos para humanização de anticorpo anti-VEGF. Em certas modalidades, pode ser desejável gerar variantes de Sequência de aminoácido destes anticorpos humanizados, particularmente onde estes aumentam a afinidade de ligação ou outras propriedades biológicas do anticorpo humanizado. O exemplo 3 descreve metodologias para geração de variantes de Sequência de aminoácido de um anticorpo anti-VEGF com afinidade realçada relativa ao anticorpo parental.

[00101] As variantes de Sequência de aminoácido do anticorpo anti-VEGF são preparadas introduzindo-se mudanças de nucleótido apropriado no DNA de anticorpo anti-VEGF, ou por síntese de peptídeo. Tais variantes incluem, por exemplo, deleções de, e/ou inserções em e/ou substituições de, resíduos nas Sequências de aminoácido dos anticorpos anti-VEGF dos exemplos aqui. Qualquer combinação de deleção, inserção, e substituição é feita para chegar à construção final, contanto que a construção final possua as características desejadas. As mudanças de aminoácido podem alterar os processos pós-tradução do anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante, tal como mudando o número ou posição de sítios de glicosilação.

[00102] Um método útil para identificação de certos resíduos ou regiões do anticorpo anti-VEGF que são localizações preferidas para mutagênese é chamado “mutagênese de varredura de alanina”, como descrito por Cunningham e Wells, *Science*, 244: 1081 - 1085 (1989). Aqui, um resíduo ou grupo de resíduos alvo são identificados (por exemplo, resíduos alterados tal como arg, asp, his, lys e glu) e substituídos por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (mais preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno VEGF. Aquelas localizações de aminoácido demonstrando sensibilidade funcional às substituições então são refinadas por outra introdução ou outras variantes em, ou para, os sítios de substituição. Dessa maneira, enquanto o sítio para introdução de uma variação de Sequência de aminoácido é predeterminado, a natureza da mutação por si necessita não ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, a varredura de ala ou mutagênese aleatória é conduzida ao códon ou região alvo e as variantes de anticorpo anti-VEGF expressas são selecionadas quanto à atividade desejada. A mutagênese de varredura de alanina é descrita no Exemplo 3.

[00103] As inserções de Sequência de aminoácido incluem fusões de extremidade de amino e/ou carboxila variando em comprimento de um resíduo para polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-Sequência de resíduos de aminoácido único ou múltiplo. Os exemplos de inserções de extremidade incluem um anticorpo anti-VEGF com um resíduo de metionila N-terminal ou o anticorpo fundido a um rótulo de epítopo. Outras variantes de inserção da molécula do anticorpo anti-VEGF incluem a fusão à extremidade N ou C do anticorpo anti-VEGF de uma enzima ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida do soro do anticorpo (veja abaixo).

[00104] Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácido. Estas variantes têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo anti-VEGF removido e um resíduo diferente inserido em seu lugar. Os sítios de maior interesse para mutagênese substitucional incluem as regiões hipervariáveis, porém as alterações FR são também contempladas. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1 sob o cabeçalho de “substituições preferidas”. Se tais substituições resultam em uma mudança em atividade biológica, então mais alterações substanciais, denominadas “substituições exemplares” na Tabela 1, ou como ainda descrito abaixo em referência às classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos analisados.

TABELA 1

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser

Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[00105] As modificações substanciais nas propriedades biológicas do anti-corpo são executadas selecionando-se substituições que diferem significantemente em seus efeitos em manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação de folha ou hélice, (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) a carga da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base em propriedades de cadeia lateral comuns.

- (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- (3) acídica: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação de cadeia: gly, pro; e

(6) aromática: trp, tyr, phe.

[00106] As substituições não-conservativas vincularão de um membro de uma destas classes para outra classe.

[00107] O resíduo de cisteína não-envolvido em manutenção da conformação própria do anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante também pode ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir a reticulação aberrante. Contrariamente, a(s) ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionadas ao anticorpo para melhorar sua estabilidade (particularmente onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

[00108] Um tipo particularmente preferido de variante substitucional envolve substituir um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a(s) variante(s) resultantes selecionadas para outro desenvolvimento terá(ão) propriedades biológicas melhoradas relativas ao anticorpo parental do qual elas são geradas. Um conveniente meio de geração tal como variantes substitucionais é o amadurecimento de afinidade empregando-se a exposição de fago (veja o Exemplo 3 aqui). Resumidamente, diversos sítios de região hipervariável (por exemplo os sítios 6 - 7) são mutados para gerar todas as substituições de amino possíveis. As variantes de anticorpo dessa maneira geradas são expostas em um estilo monovalente de partículas de fago filamentoso como fusões ao produto de gene III de M13 embalado dentro de cada partícula. As variantes exibidas de fato são então analisadas quanto a suas atividades biológicas (por exemplo, afinidade de ligação) como aqui descrito. A fim de identificar os sítios de região hipervariável de candidato para modificação, a mutagênese de varredura de alanina (veja o Exemplo 3) pode ser realizada para identificar os resíduos de região

hipervariável contribuindo significantemente para ligação de antígeno. Alternativamente, ou em adição, ela pode ser benéfica para analisar uma estrutura de cristal do complexo de antígeno-anticorpo para identificar os pontos de contato entre o anticorpo e VEGF humano. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido à análise conforme aqui descrito e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais testes relevantes podem ser selecionados para outro desenvolvimento.

[00109] Outro tipo de variante de amino do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Por alteração entende-se deletar uma ou mais porções de carboidrato encontradas no anticorpo, e/ou adicionar um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo.

[00110] A glicosilação de anticorpos é tipicamente ou ligada por N ou ligada por O. Ligada por N refere-se à ligação da porção de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As Sequências de tripeptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as Sequências de reconhecimento para ligação enzimática da porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Dessa maneira, a presença de qualquer destas Sequências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. A glicosilação ligada por O refere-se à ligação de um dos açúcares de N-acetylglactosamina, galactose ou xilose a um ácido de hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina possam ser também empregadas.

[00111] A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é convenientemente realizada alterando-se a Sequência de aminoácido tal que ela contenha uma ou mais das Sequências de tripeptídeo acima descritas (para sítios de glicosilação ligados por N). A alteração pode também ser feita pela adição de, ou substituição

por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à Sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação ligados por O).

[00112] As moléculas de ácido nucléico codificando variantes de Sequência de aminoácido do anticorpo anti-VEGF são preparadas por diversos métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, porém não são limitados a, isolamento de uma fonte natural (no caso de variantes de Sequência de aminoácido de ocorrência natural) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou direcionada ao sítio), mutagênese de PCR, e mutagênese de cassette de uma variante anteriormente preparada ou uma versão não-variante do anticorpo anti-VEGF.

(v) *Anticorpos Humanos*

[00113] Como uma alternativa para humanização, os anticorpos humanos podem ser gerados. Por exemplo, é agora possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongo) que são capazes, na imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção de homozigoto do gene de região de união de cadeia pesada de anticorpo ( $J_H$ ) em camundongo mutante quimérico e linhagem de germe resulta em completa inibição de produção de anticorpo endógeno. A transferência da disposição do gene de imunoglobulina de linhagem de germe humano em tal camundongo mutante de linhagem de germe resultará na produção de anticorpos humanos em desafio de antígeno. Veja, por exemplo, Jakobovits e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits e outros, *Nature*, 362: 255 - 258 (1993); Brugermann e outros, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); e as Patentes U. S. nºs 5.591.669, 5.589.369 e 5.545.807. Os anticorpos humanos podem também ser derivados de bibliotecas de exibição de fago (Hoogenboom e outros, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 - 597 (1991); e as Patentes U. S.

nºs 5.565.332 e 5.573.905). Como acima descrito, os anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (veja as Patentes U. S. nºs 5.567.610 e 5.229.275).

(vi) *Fragments de Anticorpos*

[00114] Em certas modalidades, o anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante é um fragmento de anticorpo. Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja, por exemplo, Morimoto e outros, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107 - 117 (1992) e Brennan e outros, *Science* 229: 81 (1985)). Entretanto, estes fragmentos podem agora ser diretamente produzidos por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimicamente unidos para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter e outros, *Bio/Technology* 10: 163 - 167 (1992)). Em outra modalidade, o F(ab')<sub>2</sub> é formado empregando-se o zíper de leucina GCN4 para promover reunião da molécula F(ab')<sub>2</sub>. De acordo com outra aproximação, os fragmentos de Fv, Fab ou F(ab')<sub>2</sub> podem ser isolados diretamente da cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o versado na técnica.

(vii) *Anticorpos Multiespecíficos*

[00115] Em algumas modalidades, pode ser desejável gerar anticorpos anti-VEGF humanizados ou variantes multiespecíficos (por exemplo, bi-específico), tendo especificidades de ligação para pelo menos dois diferentes epítopos. Os anticorpos bi-específicos exemplares podem ligar-se a dois diferentes epítopos da proteína VEGF. Alternativamente, uma ramificação de anti-VEGF pode ser combinada com uma ramificação que liga-se a uma molécula de partida em um leucócito tal como um molécula receptora de célula T (por exemplo, CD2 ou

CD3), ou receptores Fc para IgG (Fc $\gamma$ R), tal como Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) e Fc $\gamma$ RIII (CD16) a fim de focalizar os mecanismos de defesa celular para a célula de expressão VEGF. Os anticorpos bi-específicos podem também ser empregados para localizar os agentes citotóxicos para as células que expressam VEGF. Estes anticorpos possuem uma ramificação de ligação de VEGF e uma ramificação que liga-se ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferon- $\alpha$ , alcalóide vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Os anticorpos bi-específicos podem ser preparados como anticorpos completos total ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos bi-específicos F(ab')<sub>2</sub>).

[00116] De acordo com outra aproximação para preparação de anticorpos bi-específicos, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser construída para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados de cultura de célula recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio C<sub>H</sub>3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais aminoácidas pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). Compensatoriamente "cavidades" de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grandes são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo-se as cadeias laterais grandes com outras menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isto fornece um mecanismo para aumentar a produção do heterodímero em outros produtos finais não requeridos tais como homodímeros. Veja WO96/27011 publicada em 6 de setembro de 1996.

[00117] Os anticorpos bi-específicos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugado". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser unido à avidina, o outro à biotina. Os anticorpos heteroconjugados podem ser preparados empregando-se quaisquer métodos de reticulação conveniente. Os

agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica, e são descritos na Patente U. S. nº 4.676.980, junto com diversas técnicas de reticulação.

[00118] As técnicas para geração de anticorpos bi-específicos de fragmentos de anticorpo foram também descritas na literatura. Por exemplo, os anticorpos bi-específicos podem ser preparados empregando-se ligações químicas. Brennan e outros, *Science* 229: 81 (1985) descrevem um procedimento onde os anticorpos intactos são proteoliticamente divididos para gerar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexão de ditiol de arsenita de sódio para estabilizar os ditióis vicinais e prevenir formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é então reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo bi-específico. Os anticorpos bi-específicos produzidos podem ser empregados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas. Em ainda uma outra modalidade, os fragmentos de Fab'-SH diretamente recuperados de *E. coli* podem ser quimicamente unidos *in vitro* para formar anticorpos bi-específicos. Shalaby e outros, *J. Exp. Med.* 175: 217 - 225 (1992).

[00119] Várias técnicas para preparar e isolar os fragmentos de anticorpo bi-específico diretamente de cultura de célula recombinante foram também descritas. Por exemplo, os anticorpos bi-específicos foram produzidos empregando-se zíperes de leucina. Kostelny e outros, *J. Immunol.* 148 (5): 1547 - 1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções de Fab' de dois diferentes anticorpos pela fusão de gene. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região principal para formar monômeros e então re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode

também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de “*diobody*” descrita por Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444 - 6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para preparação de fragmentos de anticorpo bi-específico. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada ( $V_H$ ) conectado a um domínio variável de cadeia leve ( $V_L$ ) por um ligador que é muito curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Portanto, os domínios  $V_H$  e  $V_L$  de um fragmento são forçados a unir-se com os domínios complementares  $V_L$  e  $V_H$  de outro fragmento, desse modo formando dois sítios de ligação de antígeno. Outra estratégia para preparação de fragmentos de anticorpo bi-específico pelo uso de dímeros de cadeia única Fv (sFv) também foi reportada. Veja Gruber e outros, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994). Alternativamente, o anticorpo bi-específico pode ser um “anticorpo linear” produzido conforme descrito em Zapata e outros, *Protein Eng.* 8(10): 1057 - 1062 (1995).

[00120] Os anticorpos com mais do que duas valências são contempladas. Por exemplo, os anticorpos tri-específicos podem ser preparados. Tutt e outros, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

#### *(viii) Outras modificações*

[00121] Outras modificações do anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante são contemplados. Por exemplo, pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção com respeito à função efetora, a fim de realçar a eficácia do anticorpo em tratamento de câncer, por exemplo. Por exemplo, o(s) resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, desse modo permitindo a formação de ligação de dissulfeto de inter-cadeia nesta região. O anticorpo homodimérico dessa maneira gerado pode ter capacidade de internalização melhorada e/ou morte celular mediada por complemento aumentada e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Veja Caron e outros, *J. Exp. Med.* 176: 1191 -

1195 (1992) e Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918 - 2922 (1992). Os anticorpos homodiméricos com atividade de antitumor realçada podem também ser preparados empregando-se reticuladores heterobifuncionais conforme descrito em Wolff e outros, Cancer Research 53: 2560 - 2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser engenheirado que tem regiões Fc duais e pode desse modo ter lise de complemento e capacidades ADCC realçadas. Veja Stevenson e outros, Anti-Cancer Drug Design 3; 219 - 230 (1989).

[00122] A invenção também pertence a imunoconjugados compreendendo o anticorpo descrito, aqui conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, parental bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou os seus fragmentos), ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

[00123] Os agentes quimioterapêuticos úteis na geração de tais imunoconjugados foram acima descritos. As toxinas enzimaticamente ativas e os seus fragmentos que podem ser empregados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos de não ligação de toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia de ricina A, cadeia de abrina A, cadeia de modecina A, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, feno-micina, enomicina e os tricotecenos. Diversos radionuclídeos são disponíveis para a produção de anticorpos anti-VEGF radioconjugados. Os exemplos incluem  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{186}\text{Re}$ .

[00124] Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são preparados empregando-se diversos agentes de união de proteína bifuncional tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como HCL de adipimidato de dimetila), ésteres ativos

(tais como suberato de dissucinimidila), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos bis-azidos bis (p-azidobenzoíla) (tal como hexanodiamina), derivados de diazônio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodimina), diisocianatos (tal como tolieno 2,6-diisocianato), e compostos de flúor bis-ativo (tal como 1,5-di-flúor-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada conforme descrito em Vitetta e outros, *Science* 238: 1098 (1987). O ácido triaminapentaacético de 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno rotulado por Carbono 14 (MX-DTPA) é um agente de quelação exemplar para conjugação de radionucleótido ao anticorpo. Veja WO94/11026.

[00125] Em outra modalidade, o anticorpo pode ser conjugado a um “receptor” (tal como streptavidina) para utilização em pré-rotulamento de tumor onde o conjugado de receptor de anticorpo é administrado ao paciente, seguido pela remoção de conjugado não-ligado da circulação empregando um agente de limpeza e então administração de um “ligante” (por exemplo, avidina) que é conjugada a um agente citotóxico (por exemplo, um radionuclídeo).

[00126] Os anticorpos anti-VEGF aqui descritos podem também ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados pelos métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein e outros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688 (1985); Hwang e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030 (1980); e Patentes U. S. nºs 4.485.045 e 4.544.545. Os lipossomas com tempo de circulação realçado são descritos na Patente U. S. nº 5.013.556.

[00127] Os lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeo compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados por meio de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas conforme

descrito em Martin e outros, *J. Biol. Chem.* 257: 286 - 288 (1982) via uma reação de intercâmbio de dissulfeto. Um agente quimioterapêutico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente contido dentro do lipossoma. Veja Gabizon e outros, *J. National Cancer Inst.* 81 (19): 1484 (1989).

[00128] O anticorpo da presente invenção pode também ser empregado em ADEPT conjugando-se o anticorpo a uma enzima de ativação de pró-droga que converte uma pró-droga (por exemplo, um agente quimioterapêutico de peptídila, veja WO81/01145) a uma droga anticâncer ativa. Veja, por exemplo, WO 88/07378 e Patente U. S. nº 4.975.278.

[00129] O componente de enzima do imunoconjunto útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de atuar em uma pró-droga em um tal modo a fim de convertê-la em sua forma citotóxica mais ativa.

[00130] As enzimas que são úteis no método desta invenção incluem, porém não são limitadas a, fosfatase alcalina útil para converter pró-drogas contendo fosfato em drogas livres; arilsulfatase útil para converter pró-drogas contendo sulfato em drogas livres; deaminase de citosina útil para converter 5-fluorocitosina não-tóxica na droga anticâncer, 5-fluorouracila; proteases, tais como protease de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-drogas contendo peptídeo em drogas livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-drogas que contêm substituentes de D-aminoácido; enzimas de separação de carboidrato tais como β-galactosidase e neuraminidase úteis para converter pró-drogas glicosiladas em drogas livres; β-lactamase útil para converter drogas derivatizadas com β-lactamas em drogas livres; e amidases de penicilina, tal como amidase de penicilina V ou amidase de penicilina G, úteis para converter drogas derivatizadas em seus nitrogênios de amina com grupos fenoxiacetila ou fenilacetila, respectivamente, em drogas livres. Alternativamente, os anticorpos com

atividade enzimática, também conhecidos na técnica como “abzimas”, podem ser empregados para converter as pró-drogas da invenção em drogas ativas livres (veja, por exemplo, Massey, *Nature* 328: 457 - 458 (1987)). Os conjugados de abzima de anticorpo podem ser preparados conforme aqui descrito para liberação da abzima para uma população de célula tumoral.

[00131] As enzimas desta invenção podem ser covalentemente ligadas aos anticorpos anti-VEGF pelas técnicas bem conhecidas na área tal como o uso dos reagentes de reticulação heterobifuncionais acima descritos. Alternativamente, as proteínas de fusão compreendendo pelo menos a região de ligação de antígeno de um anticorpo da invenção ligadas a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma enzima da invenção podem ser construídas empregando-se as técnicas de DNA recombinante bem conhecidas na área (veja, por exemplo, Neuberger e outros, *Nature* 312: 604 - 608 (1984)).

[00132] Em certas modalidades da invenção, pode ser desejável para uso um fragmento de anticorpo, em vez de um anticorpo intacto, para aumentar a penetração de tumor, por exemplo. Neste caso, pode ser desejável modificar o fragmento de anticorpo a fim de aumentar sua meia vida de soro. Isto pode ser conseguido, por exemplo, por incorporação de um epítopo de ligação de receptor de recuperação no fragmento de anticorpo (por exemplo, por mutação da região apropriada no fragmento de anticorpo ou por incorporação do epítopo em um rótulo de peptídeo que é então fundido ao fragmento de anticorpo em qualquer terminação ou no centro, por exemplo, por síntese de DNA ou peptídeo). Veja WO96/32478 publicado em 17 de outubro de 1996.

[00133] O epítopo de ligação de receptor de recuperação geralmente constitui uma região onde qualquer um ou mais resíduos de aminoácido de um ou dois loops de um domínio Fc são transferidos para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. Mesmo mais preferivelmente, três ou mais resíduos de um

ou dois loops do domínio Fc são transferidos. Ainda mais preferido, o epítopo é tomado do domínio CH2 da região Fc (por exemplo, de um IgG) e transferido para a região CH1, CH3, ou V<sub>H</sub>, ou mais do que uma tal região do anticorpo. Alternativamente, o epítopo é tomado do domínio CH2 da região Fc e transferido para a região C<sub>L</sub> ou região V<sub>L</sub>, ou ambas, do fragmento de anticorpo.

[00134] Em uma modalidade mais preferida, o epítopo de ligação de receptor de recuperação compreende a Sequência: PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 17), e opcionalmente ainda compreende uma Sequência selecionada do grupo consistindo em HQSLGTQ (SEQ ID NO: 18), HQNLSDGK (SEQ ID NO: 19), HQNISDGK (SEQ ID NO: 20), ou VISSHLGQ (SEQ ID NO: 21), particularmente onde o fragmento de anticorpo é um Fab ou F(ab')<sub>2</sub>. Em outra modalidade mais preferida, o epítopo de ligação de receptor de recuperação é um polipeptídeo contendo as Sequência(s): HQNLSDGK (SEQ ID NO:19), HQNISDGK (SEQ ID NO: 20), ou VIS-SHLGQ (SEQ ID NO: 21) e a Sequência: PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:17).

[00135] As modificações covalentes do anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante são também incluídas dentro do escopo desta invenção. Elas podem ser feitas por síntese química ou por divisão enzimática ou química do anticorpo, se aplicável. Outros tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidos na molécula reagindo-se os resíduos de amino ácido alvo do anticorpo com um agente de derivatização orgânica que é capaz de reagir com as cadeias laterais selecionadas ou os resíduos de extremidade N ou C. As modificações covalentes exemplares de polipeptídeos são descritas na Patente U. S. nº 5.534.615, especificamente incorporadas aqui por referência. Um tipo preferido de modificação covalente do anticorpo compreende ligação do anticorpo a um dos diversos polímeros não-proteináceos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, ou polioxialquilenos, da maneira estabelecida nas Patentes U. S. nºs 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 ou 4.179.337.

**B. Vetores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes**

[00136] A invenção também fornece ácido nucléico isolado codificando o anticorpo anti-VEGF humanizado ou variante, vetores e células hospedeiras compreendendo o ácido nucléico, e técnicas recombinantes para a produção do anticorpo.

[00137] Para a produção recombinante do anticorpo, a codificação de ácido nucléico pode ser isolada e inserida em um vetor replicável para outro cloneamento (amplificação do DNA) ou para expressão. Em outra modalidade, o anticorpo pode ser produzido por recombinação homóloga, por exemplo, conforme descrito na Patente U. S. nº 5.204.244, especificamente incorporada aqui por referência. O DNA codificando o anticorpo monoclonal é facilmente isolado e seqüenciado empregando-se os procedimentos convencionais (por exemplo, empregando-se sondas de oligonucleotídeo que são capazes de ligar especificamente os genes codificando as cadeias pesadas e leves do anticorpo). Muitos vetores são disponíveis. Os componentes vetores geralmente incluem, porém não são limitados a, uma ou mais das seguintes: uma Sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento realçador, um promotor, e uma Sequência de terminação de transcrição, por exemplo, conforme descrito na Patente U. S. nº 5.534.615 emitida em 9 de julho de 1996 e especificamente incorporada aqui por referência.

[00138] As células hospedeiras adequadas para cloneamento ou expressão do DNA nos vetores aqui são as células procariote, levedura, ou eucariote superior descritas acima. As procariotes adequadas para este propósito incluem eubactéria, tal como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriáceas tais como Escherichia, por exemplo, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, por exemplo, Salmonella typhimurium, Serratia, por exemplo, Serratia marcescans, e Shigella, bem como Bacilos

tal como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P descrito em DD 266.710 publicada em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Um hospedeiro de cloneamento preferido *E. coli* é o *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras cepas tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) sejam adequadas. Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitantes.

[00139] Em adição aos procariotes, os micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou levedura são hospedeiros de cloneamento ou expressão adequados para vetores de codificação de anticorpo anti-VEGF. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de baker comum, é o mais comumente empregado entre os microorganismos hospedeiros eucarióticos inferiores. Entretanto, diversos gêneros, espécies e cepas são comumente disponíveis e úteis aqui, tais como os hospedeiros *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, tais como por exemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. burgarius* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. walpii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tais como *Schwanniomyces occidentalis*; e fungo filamentoso tal como, por exemplo, hospedeiros *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolipocladium* e *Aspergillus* tais como *A. nidulans* e *A. niger*.

[00140] As células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpo anti-VEGF glicosilado são derivadas de organismos multicelulares. Os exemplos de células invertebradas incluem células de planta e insetos. Diversas cepas e variantes baculovirais e células hospedeiras de inseto permissíveis correspondentes de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegyptii* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruit-

fly), e *Bombyx mori* foram identificados. Diversas das cepas virais para transfecção são publicamente disponíveis, por exemplo, a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais viroses podem ser empregadas como o vírus presente de acordo com a presente invenção, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*. As culturas de células de planta de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate, e tabaco podem também ser utilizadas como hospedeiras.

[00141] Entretanto, o interesse foi maior nas células de vertebrados, e propagação de células de vertebrados em cultura (cultura de tecido) tornou-se um procedimento de rotina. Os exemplos de linhagens de célula hospedeira de mamífero são linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico humano (células 293 ou 293 subclonadas para desenvolvimento em cultura de suspensão, Graham e outros, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células Sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243 - 251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamífero de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather e outros, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44 - 68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

[00142] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou cloneamento acima descritos para produção de anticorpo anti-VEGF e cultivadas em meio nutriente convencional modificado quando apropriado para

indução de promotores, selecionando transformantes, ou amplificando os genes codificando as Sequências desejadas.

[00143] As células hospedeiras empregadas para produzir o anticorpo anti-VEGF desta invenção podem ser cultivadas em diversos meios. Os meios comercialmente disponíveis tais como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) são adequados para cultura das células hospedeiras. Além disso, qualquer dos meios descritos em Ham e outros, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes e outros, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes U. S. nºs 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, ou 5.122.469; WO 90/03430, WO 87/00195, ou Patente U. S. nº Re. 30.985 pode ser empregado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado quando necessário com hormônios e/ou outros fatores de desenvolvimento (tal como insulina, transferrina, ou fator de desenvolvimento epidérmico), sais (tal como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina e timidina), antibióticos (tal como a droga GEN-TAMYCINTM), elementos de traço (definidos como compostos inorgânicos usualmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos em concentrações apropriadas que seriam conhecidas por aqueles versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH, e outros, são aquelas previamente empregadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e será evidente para o versado na técnica.

[00144] Quando empregando as técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásмico, ou diretamente segregado no meio. Se o anticorpo é produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detritos particulados, qualquer das células hospedeiras ou fragmentos

lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltragem. Carter e outros, Bio/ Technology 10: 163 - 167 (1992) descrevem um procedimento para isolamento de anticorpos que são segregados ao espaço periplasmico de *E. coli*. Resumidamente, a pasta celular é derretida na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) durante cerca de 30 min. Os detritos celulares podem ser removidos por centrifugação. Onde o anticorpo é segregado no meio, os sobrenadantes de tais sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados empregando-se um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltragem Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease tal como PMSF pode ser incluído em qualquer das etapas anteriores para inibir proteólise e os antibióticos podem ser incluídos para prevenir o desenvolvimento de contaminantes adventícios.

[00145] A composição de anticorpo preparada das células pode ser purificada empregando-se, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise, e cromatografia de afinidade, com cromatografia de afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequabilidade de proteína A como um ligante de afinidade depende das espécies e isótipo de qualquer domínio de imunoglobulina Fc que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser empregada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas humanas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  ou  $\gamma 4$  (Lindmark e outros, J. Immunol. Meth. 62: 1 - 13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isótipos de camundongo e para humano  $\gamma 3$  (Guss e outros, EMBO J. 5: 1567 - 1575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade é ligado é mais freqüentemente agarose, porém outras matrizes são disponíveis. As matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro de poro controlado ou benzeno poli(estirenodivinil) permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de pro-

cessamento menores do que podem ser obtidos com a agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABX™ (J. t. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteína tal como fracionamento em uma coluna de permuta de íon, precipitação de etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™, cromatografia em uma resina de permuta de ánion ou cátion (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amônio são também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

[00146] Seguindo qualquer etapa(s) de purificação preliminar(es), a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e os contaminantes pode ser submetida à cromatografia de interação hidrofóbica de pH baixo empregando um tampão de eluição em um pH entre cerca de 2,5 a 4,5, preferivelmente executado em baixas concentrações de sal (por exemplo de cerca de 0 a 0,25 M de sal).

#### C. Formulações Farmacêuticas

[00147] As formulações terapêuticas do anticorpo são preparadas por estocagem misturando-se o anticorpo tendo o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizadores fisiologicamente aceitáveis opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> Edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os veículos, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são não-tóxicos para recipientes nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzila; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool de fenol, butila ou benzila;

alquil parabenos tal como de metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona, aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes de quelação tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal tais como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não-iônicos tais como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> ou polietileno glicol (PEG).

[00148] A formulação aqui pode também conter mais do que um composto ativo quando necessário para a indicação particular sendo tratada, preferivelmente aquelas com atividades complementares que não afetam de modo adverso mutuamente (veja a Seção F abaixo). Tais moléculas são adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido

[00149] Os ingredientes ativos podem também ser apanhados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsula de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacílato), respectivamente, em sistemas de liberação de droga coloidal (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nano-cápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edição, Osol, A. Ed. (1980).

[00150] As formulações a serem empregadas para administração in vivo devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado por filtragem através de membranas de filtragem estéreis.

[00151] As preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Exemplos de preparações de liberação prolongada adequadas incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes são na forma de artigos moldados, por exemplo, películas, ou microcápsula. Os exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (Patente U. S. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de vinila de etileno não degradável, copolímeros de ácido glicólico de ácido lático degradáveis, tais como o Lupron Depot™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido lático-ácido glicólico e acetato de leuprólico), e poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico. Enquanto polímeros tais como acetato de vinila de etileno e ácido glicólico de ácido lático possibilitam a liberação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas durante períodos de tempo menores. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um longo tempo, eles podem desnaturar ou agregar como um resultado da exposição à umidade a 37°C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis alterações em imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser planejadas para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é revelado para ser formação de ligação S-S intermolecular por meio de intercâmbio de tio-dissulfeto, a estabilização pode ser obtida por modificação de resíduos de sulfidrila, liofiliação de soluções acídicas, controlando o conteúdo de umidade, empregando aditivos apropriados, e desenvolvendo composições de matriz de polímero específico.

#### D. Empregos não-terapêuticos para o Anticorpo

[00152] Os anticorpos da invenção podem ser empregados como agentes de purificação de afinidade. Neste processo, os anticorpos são imobilizados em uma

fase sólida tal como resina de Sephadex ou papel filtro, empregando métodos bem conhecidos na técnica. O anticorpo imobilizado é contactado com uma amostra contendo a proteína VEGF (ou seu fragmento) a ser purificado, e a seguir o suporte é lavado com um solvente adequado que removerá substancialmente todo o material na amostra exceto a proteína VEGF, que é ligada ao anticorpo imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, tal como tampão de glicina, pH 5,0, que liberará a proteína VEGF do anticorpo.

[00153] Os anticorpos anti-VEGF podem também ser úteis em testes diagnósticos para proteína VEGF, por exemplo, detectando sua expressão em células, tecidos ou soro específicos. Tais métodos diagnósticos podem ser úteis em diagnose de câncer.

[00154] Para aplicações diagnósticas, o anticorpo tipicamente será rotulado com uma porção detectável. Diversos rótulos são disponíveis que podem ser geralmente agrupados nas seguintes categorias:

(a) Radioisótopos, tais como 35S, 14C, 125I, 3H e 131I. O anticorpo pode ser rotulado com o radioisótopo empregando-se as técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 e 2, Coligen e outros, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991) por exemplo, e a radioatividade pode ser medida empregando-se contagem de cintilação.

(b) Rótulos Fluorescentes tais como quelatos terrosos raros (quelatos európio) ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansila, Lissamina, ficoeritrina e Texas Red são disponíveis. Os rótulos fluorescentes podem ser conjugados ao anticorpo empregando-se as técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, supra, por exemplo. A fluorescência pode ser quantificada empregando-se um fluorímetro.

(c) Vários rótulos de substrato de enzima são disponíveis e a Patente U.

S. nº 4.275.149 fornece uma revisão de alguns destes. A enzima geralmente catalisa uma alteração química do substrato cromogênico que pode ser medido empregando-se várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma mudança de cor em um substrato, que pode ser medida espectrofotometricamente. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou quimiluminescência do substrato. As técnicas para quantificação de uma mudança em fluorescência estão acima descritas. O substrato quimiluminescente torna-se eletronicamente excitado por uma reação química e pode então emitir luz que pode ser medida (empregando-se um quimiluminômetro, por exemplo) ou doar energia a um aceitante fluorescente. Exemplos de rótulos enzimáticos incluem luciferases (por exemplo, luciferase de vagalume e luciferase bacterial; A patente U. S. nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, desidrogenase de malato, urease, peroxidase tais como peroxidase de rabano-silvestre (HRPO), fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, glucoamilase, lisozima, oxidases de sacarídeo (por exemplo, oxidase de glicose, oxidase de galactose, e desidrogenase de glicose-6-fosfato), oxidases heterocíclicas (tais como oxidase de uricase e xantina), lactoperoxidase, microperoxidase, e outros. As técnicas para conjugar enzimas a anticorpos são descritas em O'Sullivan e outros. Métodos para a Preparação de Conjugados de Anticorpos de Enzima para uso em Imunoteste de enzima, em *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147 - 166 (1981).

[00155] Exemplos de combinações de substrato de enzima incluem, por exemplo:

(i) Peroxidase de rabano-silvestre (HRPO) com peroxidase de hidrogênio como um substrato, onde a peroxidase de hidrogênio oxidiza um precursor de tintura (por exemplo, diamina de ortofenileno (OPD) ou cloridrato de benzidina de 3,3',5,5'-tetrametila (TMB));

(ii) Fosfatase alcalina (AP) com fosfato de para-Nitrofenila como substrato cromogênico; e

(iii)  $\beta$ -D-galactosidase ( $\beta$ -D-Gal) com um substrato cromogênico (por exemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidase) ou substrato fluorogênico de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidase.

[00156] Diversas outras combinações de substrato de enzima são disponíveis para aqueles versados na técnica. Para uma revisão geral destas, veja as Patentes U. S. nºs 4.275.149 e 4.318.980.

[00157] Algumas vezes, o rótulo é indiretamente conjugado com o anticorpo. O técnico versado estará ciente de várias técnicas para obtenção disto. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado com biotina e qualquer das três amplas categorias de rótulos mencionadas acima pode ser conjugada com avidina, ou vice-versa. A biotina liga-se seletivamente à avidina e portanto, o rótulo pode ser conjugado com o anticorpo nesta maneira indireta. Alternativamente, para obter conjugação indireta do rótulo com o anticorpo, o anticorpo é conjugado com um hapteno pequeno (por exemplo, digoxina) e um dos diferentes tipos de rótulos acima mencionados é conjugado com um anticorpo anti-hapteno (por exemplo, anticorpo de anti-digoxina). Portanto, a conjugação indireta do rótulo com o anticorpo pode ser obtida.

[00158] Em outra modalidade da invenção, o anticorpo anti-VEGF necessita não ser rotulado, e a sua presença pode ser detectada empregando-se um anticorpo rotulado que liga-se ao anticorpo VEGF.

[00159] Os anticorpos da presente invenção podem ser empregados em qualquer método de teste conhecido, tal como testes de ligação competitiva, testes sanduíche diretos e indiretos, e testes de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147 - 158 (CRC Press, Inc. 1987).

[00160] Os testes de ligação competitiva confiam na capacidade de um padrão rotulado para competir com o analisado de amostra de teste para ligação com uma quantidade limitada de anticorpo. A quantidade de proteína VEGF na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que torna-se ligada aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que torna-se ligada, os anticorpos geralmente são insolubilizados antes ou após a competição, a fim de que o padrão e o analisado que são ligados aos anticorpos possam convenientemente ser separados do padrão e analisado que permanecem desligados.

[00161] Os testes sanduíche envolvem o emprego de dois anticorpos, cada qual capaz de ligar-se a uma diferente porção imunogênica, ou epítopo, ou da proteína a ser detectada. Em um teste sanduíche, o analisado de amostra de teste é ligado por um primeiro anticorpo que é imobilizado em um suporte sólido, e a seguir um segundo anticorpo liga-se ao analisado, portanto formando um complexo de três partes insolúvel. Veja, por exemplo, a Patente U. S. nº 4.376.110. O segundo anticorpo pode sozinho ser rotulado com uma porção detectável (testes sanduíche diretos) ou pode ser medido empregando-se um anticorpo antiimunoglobulina que é rotulado com uma parte detectável (teste sanduíche indireto). Por exemplo, um tipo de teste sanduíche é um teste ELISA, caso em que a porção detectável é uma enzima.

[00162] Para imuno-histoquímica, a amostra de tumor pode ser fresca ou congelada ou pode ser embutida em parafina e fixada com um conservante tal como formalina, por exemplo.

[00163] Os anticorpos podem também ser empregados para testes diagnósticos *in vivo*. Geralmente, o anticorpo é rotulado com um rádio nuclídeo (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ ) a fim de que o tumor possa ser localizado empregando-se imunocintilografia.

#### E. Kits de Diagnóstico

[00164] Como uma matéria de conveniência, o anticorpo da presente invenção pode ser fornecido em um kit, isto é, uma combinação empacotada de reagentes em quantidades predeterminadas com instruções para executar o teste diagnóstico. Onde o anticorpo é rotulado com uma enzima, o kit incluirá substratos e cofatores requeridos pela enzima (por exemplo, um precursor de substrato que forneça o cromofore ou fluorofore detectável). Além disso, outros aditivos podem ser incluídos tais como estabilizadores, tampões (por exemplo, um tampão de bloco ou tampão de lise) e outros. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas amplamente para fornecer concentrações em solução dos reagentes que substancialmente otimizam a sensibilidade do teste. Particularmente, os reagentes podem ser fornecidos como pós secos, usualmente liofilizados, incluindo excipientes que em dissolução fornecerão uma solução reagente tendo a concentração apropriada.

#### F. Empregos Terapêuticos para o Anticorpo

[00165] Para aplicações terapêuticas, os anticorpos anti-VEGF da invenção são administrados a um mamífero, preferivelmente um ser humano, em uma forma de dosagem farmaceuticamente aceitável tal como aquelas descritas acima, incluindo aquelas que podem ser administradas a um ser humano intravenosamente como um bolo ou por infusão contínua durante um período de tempo, por rotina intramuscular, intraperitoneal, intra-cerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, oral, tópica ou inalação. Os anticorpos são também adequadamente administrados por rotinas intratumoral, peritumoral, intralesional ou perilesional, para enxerto do local bem como efeitos terapêuticos sistêmicos. A rotina intraperitoneal é esperada ser particularmente útil, por exemplo, no tratamento de tumores ovarianos.

[00166] Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada

de anticorpo dependerá do tipo de doença a ser tratada, como acima definido, a severidade e o curso da doença, mesmo se o anticorpo é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia prévia, a história clínica do paciente e a resposta do anticorpo, e a descrição do médico assistente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente de uma única vez ou durante uma série de tratamentos.

[00167] Os anticorpos anti-VEGF são úteis no tratamento de várias doenças neoplásicas e não-neoplásicas e distúrbios. Os neoplasmas e condições relacionadas que são receptivos a tratamento incluem carcinomas de mama, carcinomas de pulmão, carcinomas gástricos, carcinomas esofageais, carcinomas colo-retal, carcinomas de fígado, carcinomas ovarianos, tecomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicais, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, endometriose, fibrossarcoma, coriocarcinoma, câncer da cabeça ou garganta, carcinoma nasofaringeal, carcinomas laringeais, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi's, melanoma, carcinomas da pele, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas de pâncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendrogioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rhabdomiossarcoma, sarcoma osteogênico, leiomiossarcomas, carcinomas do trato urinário, carcinomas da tireóide, tumor de Wilm, carcinoma de célula renal, carcinoma da próstata, proliferação vascular anormal associada com facomatoses, edema (tal como que associado com tumores do cérebro), e síndrome de Meigs.

[00168] As condições não-neoplásicas que são receptivas ao tratamento incluem artrite reumatóide, psoríasse, ateroesclerose, retinopatias diabéticas e outras proliferativas, incluindo retinopatia de prematuridade, fibroplasia retro-lental, glaucoma neovascular, degeneração macular relacionada com a idade, hiperaspasias da tireóide (incluindo a doença de Grave), transplante de córnea e outro tecido, inflamação crônica, inflamação do pulmão, síndrome nefrótica,

pré-eclâmpsia, ascite, efusão pericardial (tal como que associado com pericardite), e efusão pleural.

[00169] Degeneração macular relacionada com a idade (AMD) é uma causa de indução de grave perda de visão na população idosa. A forma exsudativa de AMD é caracterizada por neovascularização coroidal e desligamento de célula epitelial de pigmento retinal. Devido à neovascularização ser associada com uma piora dramática em prognose, os anticorpos VEGF da presente invenção são esperados ser especialmente úteis em redução da gravidade de AMD.

[00170] Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a cerca de 50 mg/kg (por exemplo, 0,1 a 20 mg/kg) de anticorpo é uma dosagem de candidato inicial para administração ao paciente, se, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Uma dosagem típica diária ou semanal deve variar de cerca de 1 µg/kg a cerca de 20 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas durante diversos dias ou mais longas, dependendo da condição, o tratamento é repetido até uma supressão desejada de sintomas de doença ocorrer. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e testes convencionais, incluindo, por exemplo, imagem radiográfica de tumor.

[00171] De acordo com outra modalidade da invenção, a eficácia do anticorpo em prevenção ou tratamento de doença pode ser aumentada administrando-se o anticorpo consecutivamente ou em combinação com outro agente que é eficaz para aqueles propósitos, tais como fator de necrose de tumor (TNF), um anticorpo capaz de inibir ou neutralizar a atividade angiogênica de fator de crescimento acídico ou fibroblasto básico (FGF) ou fator de crescimento hepatocito (HGF), um anticorpo capaz de inibir ou neutralizar as atividades coagulantes de fator de tecido, proteína C, ou proteína S (veja Esmon e outros, PCT Patent

Publication Nº WO 91/01753, publicado em 21 de fevereiro de 1991), um anticorpo capaz de ligação ao receptor HER2 (veja Hudziak e outros, Publicação de Patente PCT nº WO 89/06692, publicado em 27 de julho de 1989), ou um ou mais agentes terapêuticos mais convencionais tais como, por exemplo, agentes de alquilação, antagonistas de ácido fólico, anti-metabólitos de metabolismo de ácido nucléico, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracila, cisplatina, nucleosídeos de purina, aminas, aminoácidos, nucleosídeos de triazol, ou corticosteróides. Tais outros agentes podem ser presentes na composição sendo administrada ou podem ser administrados separadamente. Também, o anticorpo é adequadamente administrado consecutivamente ou em combinação com tratamentos radiológicos, seja envolvendo irradiação ou administração de substâncias radioativas.

[00172] Em uma modalidade, a vascularização de tumores é atacada em terapia de combinação. O anticorpo e um ou mais antagonistas anti-VEGF são administrados a pacientes sofrendo de tumor em doses terapeuticamente eficazes conforme determinado, por exemplo, observando-se necrose do tumor ou seus focos metastáticos, se existirem. Esta terapia é continuada até certo tempo quando nenhum outro efeito benéfico é observado ou exame clínico exibe nenhum traço do tumor ou quaisquer focos metastáticos. Então o TNF é administrado, sozinho ou em combinação com um agente auxiliar tal como alfa, beta ou gama-interferon, anticorpo anti-HER2, heregulina, anticorpo anti-heregulina, fator D, interleucina 1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), fator de estimulação de colônia de macrofago de granulócito (GM-CSF), ou agentes que promovem coagulação microvascular em tumores, tais como anticorpo de antiproteína C, anticorpo de antiproteína S, ou proteína de ligação C4b (veja Esmon e outros, Publicação de Patente PCT nº WO 91/01753, publicada em 21 de fevereiro de 1991), ou aquecimento ou radiação.

[00173] Uma vez que os agentes auxiliares variarão em suas eficárias, é desejável comparar seus impactos sobre o tumor por análise de matriz em estilo convencional. A administração de anticorpo anti-VEGF e TNF é repetida até o efeito clínico desejado ser obtido. Alternativamente, o anticorpo anti-VEGF é administrado junto com o TNF e, opcionalmente, com os agente(s) auxiliar(es). Nos casos onde os tumores sólidos são encontrados nos membros ou em outras localizações suscetíveis ao isolamento da circulação geral, os agentes terapêuticos aqui descritos são administrados ao tumor ou órgão isolado. Em outras modalidades, um antagonista de fator de crescimento FGF ou derivado de plaqueta (PDGF), tal como um anticorpo de neutralização de um anti-FGF ou um anti-PDGF, é administrado ao paciente em conjunção com o anticorpo anti-VEGF. Tratamentos com anticorpos anti-VEGF idealmente podem ser suspensos durante períodos de cicatrização do ferimento ou neovascularização desejável.

#### G. Artigos de Preparação

[00174] Em outra modalidade da invenção, um artigo de preparação contendo materiais úteis para o tratamento dos distúrbios acima descritos é fornecido. O artigo de preparação compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, pequenos frascos, seringas, e tubos de teste. Os recipientes podem ser formados de diversos materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente possui uma composição que é eficaz para tratamento da condição e pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um pequeno frasco tendo um tampão perfurável por meio de uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é o anticorpo anti-VEGF. O rótulo em, ou associado com, o recipiente indica que a composição é empregada para tratamento da condição de escolha. O artigo de fabricação pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável, tal

como salina tamponada por fosfato, solução de Ringer's e solução de dextrose. Ele pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros suplementos de tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e pacote com instruções para uso.

#### EXEMPLO 1

[00175] Este exemplo descreve a produção de anticorpos humanizados anti-VEGF com propriedades desejáveis de um ponto de vista terapêutico.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

[00176] *Cloneamento de Murino A4.6.1 MAb e Construção de Fab Quimérico Humano e de Camundongo:* O anti-VEGF mAb A4.6.1 de murino foi previamente descrito por Kim e outros, *Growth Factors* 7; 53 (1992) e Kim e outros. *Nature* 362: 841 (1993). O RNA total foi isolado de células de hibridoma produzindo o anti-VEGF Mab A4.6.1 empregando RNAsol (TEL-TEST) e reversamente transscrito para cDNA empregando o primer Oligo-dT e o sistema SuperScript II (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Os poços de primer de oligonucleotídeo degenerado, com base das Sequências de aminoácido de terminal N das cadeias leves e pesadas do anticorpo, foram sintetizados e empregados como os primers antecipados. Os primers reversos foram baseados nas Sequências de estrutura 4 obtidas de subgrupo kV de cadeia leve e subgrupo II de cadeia pesada de murino (Kabat e outros. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5<sup>a</sup> edição Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Após a amplificação da reação de cadeia de polimerase (PCR), os fragmentos de DNA foram ligados a um vetor de cloneamento TA (Invitrogen, San Diego, CA). Oito clones cada das cadeias leves e pesadas foram seqüenciados. Um clone com uma Sequência de consenso para o domínio VL de cadeia leve e um com uma Sequência de consenso para o domínio VH de cadeia pesada foram subclonados respectivamente no vetor pEMX1 contendo os domínios CL e CH1 humanos (Werther e outros. *J.*

*Immunol.* 157: 4986 - 4995 (1996)), dessa maneira gerando uma quimera de camundongo-humana. Este F(ab) quimérico consistido no total domínio VH A4.6.1 de murino fundido com um domínio CH1 humano em aminoácido SerH1 13 e o total domínio VL A4.6.1 de murino fundido a um domínio CL humano em aminoácido LysL107. A expressão e purificação do F(ab) quimérico foram idênticos àqueles dos F(ab)s humanizados. Os F(ab) quiméricos foram empregados como o padrão nos testes de ligação.

[00177] *Computer Graphics Models of Murine and Humanized F(ab):* Sequências dos domínios VL e VH (Figs. 1A e 1B) foram empregadas para construir um modelo gráfico de computador do domínio VL-VH A4.6.1 de murino. Este modelo foi empregado para determinar que os resíduos de estrutura devem ser incorporados no anticorpo humanizado. Um modelo do F(ab) humanizado foi também construído para verificar a seleção correta de resíduos de estrutura de murino. A construção de modelos foi executada conforme previamente descrito (Carter e outros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 - 4289 (1992) e Eigenbrot e outros. *J. Mol. Biol.* 229: 969 - 995 (1993)).

[00178] *Construção de F(ab)s Humanizados:* O plasmídeo pEMX1 empregado para mutagênese e expressão de F(ab)s em *E. coli* foi previamente descrito (Werther e outros, supra). Resumidamente, o plasmídeo contém um fragmento de DNA codificando uma cadeia leve de subgrupo I k humano de consenso (VLKI-CL) e uma cadeia pesada de subgrupo III humano de consenso (VHIII-CH1) e um promotor de fosfatase alcalina. O emprego das Sequências de consenso para VL e VH foi previamente descrito (Carter e outros, supra).

[00179] Para construir a primeira variante F(ab) de A4.6.1 humanizado, F(ab)-1, mutagênese direcionada ao sítio (Kunkel e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488 - 492 (1985)) foi executada em um padrão contendo deoxyuridina de pEMX1. Os seis CDRs de acordo com Kabat e outros, supra, foram alterados para

a Sequência A4.6.1 de murino. O F(ab)-1 portanto consistiu em uma estrutura humana completa (subgrupo I k VL e subgrupo III VH) com as seis Sequências CDR de murino completas. Os plasmídeos para todas as outras variantes F(ab) foram construídos do padrão de plasmídeo de F(ab)-1. Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* de cepa Blue XL-1 (Stratagene, San Diego, CA) para preparação de DNA de trançamento duplo e único. Para cada variante, a codificação de DNA para cadeias leves e pesadas foi completamente seqüenciada empregando-se o método de dideoxinucleotídeo (Sequenase, U. S. Biochemical Corp., Cleveland, OH). Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* cepa 16C9, um derivado de MM294, chapeado sobre placas de caldo Luria contendo 50 µg/ml de carbenicilina, e uma colônia única selecionada para expressão de proteína. A única colônia foi desenvolvida em 5 ml de caldo Luria - 100 mg/ml de carbenicilina durante 5 a 8 horas a 37°C. Os 5 ml de cultura foram adicionados a 500 ml de AP5-50 µg/ml de carbenicilina e permitido desenvolver durante 20 horas em um frasco de movimento desconcertado de 4 L a 30°C. O meio AP5 consiste em 1,5 g de glicose, 11,0 g de Hycase SF, 0,6 g de extrato de levedura (certificado), 0,19 g de MgSO<sub>4</sub> (anidro), 1,07 g de NH<sub>4</sub>Cl, 3,73 g de KCl, 1,2 g de NaCl, 120 ml de 1 M de trietanolamina, pH 7,4, em 1 L de água e então filtrado estéril por meio de um filtro Sealkeen de 0,1 mm. As células foram colhidas por centrifugação em um frasco de centrífuga de 1 L a 3000 xg e o sobrenadante removido. Após o congelamento durante uma hora, a pélete foi ressuspensão em 25 ml frios de 10 mM de Tris-1 mM de EDTA - 20% de sacarose, pH 8,0. 250 ml de 0,1 M de benzamidina (Sigma, St. Louis, MO) foram adicionados para inibir a proteólise. Após agitação suave em gelo durante 3 horas, a amostra foi centrifugada a 40.000 xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi então aplicado a uma proteína G-Sefarose CL-4B (Pharmacia, UPPsala, Sweden) coluna (0,5 ml de volume de leito) equilibrada com 10 de mM Tris-1 mM EDTA, pH 7,5. A coluna foi lavada

com 10 ml de 10 mM de Tris-1 mM EDTA, pH 7,5, e eluída com 3 ml de glicina a 0,3 M, pH 3,0, em 1,25 ml de 1 M Tris, pH 8,0. O F(ab) foi então trocado de tampão em PBS empregando-se um Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) e concentrado em um volume final de 0,5 ml. Os géis de SDS-PAGE de todos os F(ab)s foram desenvolvidos para averiguar a pureza, e o peso molecular de cada variante foi verificado por espectrometria de massa de eletrovaporização.

[00180] *Construção e Expressão de IgG Quimérico e Humanizado:* Para a geração de variantes IgG1 humanas de A4.6.1 quimérico (chIgG1) e humanizado (hulgG1), os domínios de murino ou humanizados apropriados VL e VH (F(ab)-12, Tabela 2) foram subclonados em separado, vetores pRK, previamente descritos (Eaton e outros, *Bioquímica* 25: 8343 - 8347 (1986)). A codificação de DNA para a cadeia leve inteira e a cadeia pesada inteira de cada variante foi verificada por seqüenciamento de dideoxi-nucleotídeo.

[00181] Para expressão transiente de variantes, os plasmídeos de cadeias pesada e leve foram co-transfetados em células 293 humanas (Graham e outros, *J. Gen. Virol.* 36: 59 - 74 (1977)), empregando-se um procedimento altamente eficiente (Gorman e outros, *DNA Prot. Eng. Tech.* 2: 3 - 10 (1990)). O meio foi mudado para livre de soro e colhido diariamente durante até cinco dias. Os anticorpos foram purificados dos sobrenadantes agrupados empregando-se CL-4B de Sepharose de proteína A (Pharmacia). O anticorpo eluído foi trocado de tampão em PBS empregando-se um Centricon-30 (Amicon), concentrado a 0,5 ml, filtrado estéril empregando um Millex-GV (Millipore, Bedford, MA) e estocado a 4°C.

[00182] Para a expressão estável da variante IgG1 humanizada final (rhuMAb VEGF), células ovarianas de hamster chinês (CHO) foram transfetadas com vetores dicistrônico designados para coexpressar igualmente cadeias pesadas e leves (Lucas e outros, *Nucleic Acid Res.* 24: 1774 - 79 (1996)). Os plasmídeos foram

introduzidos em células DP 12, um derivado proprietário da linhagem de célula CHO-K1 DUX B11 desenvolvida por L. Chasin (Columbia University), via lipofecção e selecionado para o desenvolvimento em meio livre de GHT (Chisholm, V. Transferência de gene de eficiência elevada em células mamíferas. Em: Glover, DM, Hames, BD. *DNA Cloning 4. Mammalian systems*. Oxford Univ. Press, Oxford pp. 1 - 41 (1996)). Aproximadamente 20 clones não amplificados foram aleatoriamente escolhidos e liberados em placas de poço 96. A relativa produtividade específica de cada colônia foi monitorada empregando-se um ELISA para quantificar o IgG humano de comprimento natural acumulado em cada poço após 3 dias e uma tintura fluorescente, Calcien AM, como um marcador sub-rogado de número de célula viável por poço. Com base nestes dados, diversos clones não amplificados foram escolhidos para outra amplificação na presença de aumento de concentrações de metotrexato. Os clones individuais sobrevidentes a 10, 50, e 100 nM de metotrexato foram escolhidos e transferidos para placas de poço 96 para análise de produtividade. Um clone, cuja reproducibilidade exigiu elevada produtividade específica, foi expandido em frascos T e empregado para inocular uma cultura giratória. Após diversas passagens, as células adaptadas por suspensão foram empregadas para culturas de produção inoculada em meio livre de soro, contendo GHT, suplementado com vários hormônios e hidrolisados de proteína. O fluido de cultura de célula colhida contendo rhuMAb VEGF foi purificado empregando-se CL-4B de Sefarose de proteína A. A pureza após esta etapa foi ~99%. A purificação subsequente à homogeneidade foi realizada empregando-se uma etapa de cromatografia de permuta de íon. O conteúdo de endotoxina do anticorpo purificado final foi < 0,10 eu/mg.

[00183] *Quantificação de F(ab) e IgG:* Para quantificação de moléculas F(ab), as placas ELISA foram revestidas com 2 µg/ml de IgG Fab anti-humano de cabra (Organon Teknika, Durham, NC) em 50 mM de tampão de carbonato, pH 9,6, a

4°C durante a noite e bloqueado com PBS - 0,5% de albumina de soro bovino (tampão de bloqueios) em temperatura ambiente durante 1 hora. Os padrões (0,78 - 50 ng/ml F(ab) humano) foram adquiridos de Chemicon (Temecula, CA). As diluições seriais de amostras em PBS - 0,5% de albumina de soro bovino - 0,05% de polissorbato 20 (tampão de teste) foram incubadas nas placas durante duas horas. F(ab) ligado foi detectado empregando-se FgG F(ab) anti-humano de cabra rotulado por peroxidase de rábano silvestre (Organon Teknika), seguido por 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como o substrato. As placas foram lavadas entre as etapas. A absorbância foi interpretada a 450 nm em uma leitora de placa Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). A curva padrão foi ajustada empregando-se um programa de ajustamento de curva de regressão não-linear de parâmetro quatro. Os pontos dos dados que caem na faixa da curva padrão foram empregados para cálculo das concentrações F(ab) de amostras. A concentração de anticorpo de comprimento natural foi determinada empregando-se IgG Fc anti-humano de cabra (Cappel, Westchester, PA) para captura e Fc anti-humano de cabra rotulado por peroxidase de rábano-picante (Cappel) para detecção. O IgG1 humano (Chemicon) foi empregado como padrão.

[00184] *Teste de Ligação VEGF:* Para medição da atividade de ligação VEGF de F(ab)s, as placas ELISA foram revestidas com 2 µg/ml de F(ab')<sub>2</sub> de coelho para IgG Fc humano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) e bloqueado com tampão de bloqueio (acima descrito). O meio condicionado diluído contendo 3 ng/ml de KDR-IgG (Park e outros, *J. Biol. Chem.* 269: 25646 - 25645 (1994)) em tampão de bloqueio foi incubado na placa durante uma hora. Os padrões (6,9 - 440 ng/ml de F(ab) quimérico) e séries de amostras em duas vezes foram incubados com 2 nM de VEGF biotinilado durante uma hora em tubos. As soluções dos tubos foram então transferidas para as placas ELISA e incubadas durante

uma hora. Após a lavagem, o VEGF biotinilado ligado a KDR foi detectado empregando-se estreptavidina rotulada por peroxidase de rábano silvestre (Zymed, South San Francisco, CA ou Sigma, St. Louis, MO) seguido por 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina como o substrato. As curvas de titulação foram ajustadas com um programa de ajustamento de curva de regressão não-linear de parâmetro quatro (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading PA). As concentrações de variantes F(ab) correspondendo à absorbância de ponto central da curva de titulação do padrão foram calculadas e então divididas pela concentração do padrão correspondendo à absorvência de ponto central da curva de titulação padrão. Os testes para IgG de comprimento natural foram os mesmos como para o F(ab)s exceto que o tampão de teste continha 10% de soro humano.

[00185] *Teste Biosensor BIACore™:* A ligação de VEGF dos F(ab)s humanizados e quiméricos foram comparados empregando-se um biosensor BIACore™ (Karls-son e outros. *Methods: A Comparison to Methods in Enzymology* 6: 97 a 108 (1994)). As concentrações de F(ab)s foram determinadas por análise de aminoácido quantitativo. O VEGF foi unido a um *chip* biosensor CM-5 por meio de grupos de amina primária de acordo com as instruções dos fabricantes (Pharmacia). Os cinéticos fora da taxa foram medidos por saturação do *chip* com F(ab) (35 µl de 2 µM F(ab) em uma taxa de fluxo de 20 µl/min) e então transferidos para tampão (PBS-0,05% de polis-sorbato 20). Os pontos de dados de 0 a 4500 seg. foram empregados para análise de cinético fora de faixa. A constante de taxa de dissociação ( $k_{off}$ ) foi obtida da inclinação do lote de  $\ln(RO/R)$  verso tempo, onde RO é o sinal a t=0 e R é o sinal a cada ponto do tempo.

[00186] Os cinéticos sobre taxa foram medidos empregando-se diluições de séries duplas de F(ab) (0,0625 - 2 mM). A inclinação  $K_s$ , foi obtida do lote de  $\ln(-dR/dt)$  verso tempo para cada concentração F(ab) empregando o software de

avaliação de cinéticos BIACore™ conforme descrito no manual Pharmacia Bi-sensor. R é o signal no tempo t. Os dados entre 80 e 168, 148, 128, 114, 102, e 92 seg. foram empregados para 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, e 2 mM F(ab), respectivamente. A constante taxa de associação ( $K_{on}$ ) foi obtida da inclinação do lote de  $K_s$  verso concentração de F(ab). No final de cada ciclo, a ligação de F(ab) foi removida por injeção de 5 µl de 50 mM de HCl em uma taxa de fluxo de 20 µl/min. para regenerar o *chip*.

[00187] *Teste de Desenvolvimento de Célula Endotelial:* As células endoteliais capilares derivadas de córtex adrenal bovino foram cultivadas na presença de meio Eagle's modificado por Dulbecco's de baixa glicose (DMEM) (GIBCO) suplementado com 10% de soro de bezerro, 2 mM de glutamina, e antibióticos (veículo de crescimento), essencialmente conforme previamente descrito (Leung e outros. *Science* 246: 1306 - 1309 (1989)). Para testes mitogênicos, as células endoteliais foram semeadas em uma densidade de  $6 \times 10^3$  células por poço, em 6 placas de poço em meio de crescimento. Qualquer dos muMAb VEGF A.4.6.1 ou rhuMAb VEGF foi então adicionado em concentrações variando entre 1 e 5000 ng/ml. após 2 - 3 horas, o rhVEGF165 expresso por *E. coli* purificado foi adicionado a uma concentração final de 3 ng/ml. Para controle de especificidade, cada anticorpo foi adicionado a células endoteliais na concentração de 5000 ng/ml, ou sozinho ou na presença de 2 ng/ml de bFGF. Após cinco ou seis dias, as células foram dissociadas por exposição à tripsina e contadas em um contador Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL). A variação da média não excedeu a 10%. Os dados foram analisados por um programa de ajuste de curva de parâmetro quatro (KaleidaGraph).

[00188] *Estudos de Tumor In Vivo:* As células de rhabdomiossarcoma A673 humanas (ATCC; CRL 1598) foram cultivadas como previamente descrito em DMEM/F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina e

antibióticos (Kim e outros. *Nature* 362: 841 - 844 (1993) e Borgström e outros. *Câncer Res.* 56: 4032 - 4039 (1996)). Os camundongos nus BALB/c fêmeas, de 6 - 10 semanas de idade, foram injetados subcutaneamente com  $2 \times 10^6$  células tumorais na área dorsal em um volume de 200 µl. Os animais foram então tratados com muMAb VEGF A.4.6.1, rhuMAb VEGF ou um MAb de controle direcionado contra a proteína gp 120 (Kim e outros. *Nature* 362: 841 - 844 (1993)). Ambos os MAbs anti-VEGF foram administrados nas doses de 0,5 e 5 mg/kg; o MAb de controle foi dado na dose de 5 mg/kg. Cada MAb foi administrado duas vezes semanalmente intra peritonealmente em um volume de 100 µl, iniciando 24 horas após a inoculação de célula tumoral. Cada grupo consistiu em 10 camundongos. O tamanho do tumor foi determinado em intervalos semanais. Quatro semanas após a inoculação de células tumorais, os animais foram eutanizados e os tumores foram removidos e pesados. A análise estatística foi realizada pela ANOVA.

#### RESULTADOS:

[00189] *Humanização: A Sequência de consenso para o subgrupo III de cadeia pesada humana e o subgrupo k I de cadeia leve foram empregados como a estrutura para a humanização (Kabat e outros, supra) (Figs. 1A e 1B).* Esta estrutura foi bem sucedidamente empregada na humanização de outros anticorpos de murino (Werther e outros, supra; Carter e outros, supra; Presta e outros. *J. Immunol.* 151: 2623 - 2632 (1993); e Eigenbrot e outros. *Proteínas* 18: 49 - 62 (1994)). O CDR-H1 incluiu resíduos de H26-H35. Os outros CDRs foram de acordo com Kabat e outros, supra. Todas as variantes humanizadas foram inicialmente feitas e analisadas quanto à ligação como F(ab)s expressa em *E. coli*. As produções típicas de 500 ml de frascos agitados foram de 0,1 - 0,4 mg de F(ab).

[00190] O F(ab) quimérico foi empregado como o padrão nos testes de liga-

ção. Na variante inicial, F(ab)-1, os resíduos CDR foram transferidos de um anticorpo de murino para a estrutura humana e, com base nos modelos dos F(ab)s de murino e humanizados, o resíduo na posição H49 (Ala em humano) foi mudado para o Gly de murino. Além disso, os F(ab)s que consistiram na cadeia pesada quimérica/cadeia leve de F(ab)-1, (F(ab)-2) e cadeia pesada de F(ab)-1/cadeia leve quimérica (F(ab)-3) foram gerados e testados quanto à ligação. O F(ab)-1 exibiu uma afinidade de ligação maior do que 1000 vezes reduzida do F(ab) quimérico (Tabela 2). Comparando as afinidades de ligação de F(ab)-2 e F(ab)-3 sugeriram que os resíduos de estrutura no domínio VH F(ab)-1 precisou ser alterado a fim de aumentar a ligação.

**TABELA 2:** Ligação de Variantes F(ab) Anti-VEGF Humanizadas a VEGF<sup>a</sup>

Variante	Padrão	Mudanças <sup>b</sup>	Propósito	EC50 f(ab)-X		
				F(ab) <sup>c</sup> quimérico de EC50		
				Média	S.D.	N
F(ab) quimérico	F(ab) quimérico			1,0		
F(ab)-1	FR Humano		Troca de CDR reto AlaH49 <u>Gly</u>	>1350		2
F(ab)-2			Cadeia Leve de Quimera Cadeia Pesada de F(ab)-1	>145		3
F(ab)-3			Cadeia leve de F(ab)-1 Cadeia Pesada de Quimera	2,6	0,1	2
F(ab)-4	F(ab)-1	ArgH71 <u>Leu</u> AsnH73 <u>Thr</u>	Estrutura de conformação de CDR-H2	>295		3
F(ab)-5	F(ab)-4	LeuL46 <u>Val</u>	Interface de VL-VH	80,9	6,5	2
F(ab)-6	F(ab)-5	LeuH78 <u>Ala</u>	conformação de CDR-H1	36,4	4,2	2
F(ab)-7	F(ab)-5	IleH69 <u>Phe</u>	Conformação de CDR-H2	45,2	2,3	2

F(ab)-8	F(ab)-5	<u>IleH69Phe</u> LeuH78Ala	Conformação de CDR-H2 Conformação de CDR-H1	9,6	0,9	4
F(ab)-9	F(ab)-8	<u>GlyH49Ala</u>	Conformação de CDR-H2	>150		2
F(ab)-10	F(ab)-8	<u>AsnH76Ser</u>	Estrutura	6,4	1,2	4
F(ab)-11	F(ab)-10	<u>LysH75Ala</u>	Estrutura	3,3	0,4	2
F(ab)-12	F(ab)-10	<u>ArgH94Lys</u>	Conformação de CDR-H3 - meio	1,6	0,6	4

<sup>a</sup> As variantes F(ab) de anti-VEGF foram incubadas com VEGF biotinilado e então transferidas para placas ELISA revestidas com KDR-IgG (Park e outros, supra).

<sup>b</sup> Os resíduos de murino são sublinhados; os números de resíduo são de acordo com Kabat e outros, supra.

<sup>c</sup> O desvio médio e padrão são a média das relações calculadas para cada dos testes independentes; o EC50 para F(ab) quimérico foi  $0,049 \pm 0,013$  mg/ml (1,0 nM).

[00191] Mudando os resíduos humanos H71 e H73 para suas contrapartes de murino em F(ab)-4 aumentou-se a ligação em 4 vezes (Tabela 2). A inspeção dos modelos dos F(ab)s de murino e humanizados sugeriu que o resíduo L46, encoberto na interface VL-VH e interagindo com CDR-H3 (Figura 2), deve também desempenhar um papel ou na determinação da conformação de CDR-H3 e/ou afetando a ligação dos domínios VL e VH. Quando o Val de murino foi trocado pelo Leu humano em L46 (F(ab)-5), a afinidade de ligação aumentou em quase 4 vezes (Tabela 2). Três outros resíduos de estruturas encobertas foram avaliados com base nos modelos moleculares: H49, H69 e H78. A posição H69 pode afetar a conformação de CDR-H2 ao mesmo tempo que a posição H78 pode afetar a conformação de CDR-H1 (Figura 2). Quando cada qual individualmente mudou da contraparte de humano para murino, a ligação aumentou para 2 vezes em cada caso (F(ab)-6 e F(ab)-7, Tabela 2). Quando ambos foram simultaneamente mudados, o aumento na ligação foi de 8 vezes (F(ab)-8, Tabela 2). O resíduo H49

foi originalmente incluído como o Gly de murino; quando mudou para a contraparte de consenso humana Ala, a ligação foi reduzida em 15 vezes (F(ab)-9, Tabela 2).

[00192] Em F(ab)-10 e F(ab)-11 dois resíduos em estrutura loop 3, FR-3, foram mudados para suas contrapartes de murino: AsnH76 para Ser de murino (F(ab)-10) e LysH75 para Ala de murino (F(ab)-11). Ambos afetaram um aumento relativamente pequeno em ligação (Tabela 2). Finalmente, nas Sequências humanas e de murino da posição H94 mais freqüentemente tem-se um Arg (Kabat e outros, supra). Em F(ab)-12, este Arg foi substituído pelo Lys raro encontrado no anticorpo de murino (Figura 1A) e isto resultou em ligação que foi menor do que duas vezes do F(ab) quimérico (Table 2). O F(ab)-12 foi também comparado ao F(ab) quimérico empregando-se o sistema BIACore™ (Pharmacia). Empregando esta técnica o  $K_d$  do F(ab)-12 humanizado foi duas vezes mais fraco do que aquele do F(ab) quimérico devido a igualmente um  $k_{on}$  mais lento e  $k_{off}$  mais rápido (Tabela 3).

**TABELA 3:** Ligação de Variantes F(ab) Anti-VEGF para VEGF Empregando-se o Sistema<sup>a</sup> BIACore™.

Variante	Quantidade de ligação (Fab) (RU)	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_q$ (nM)
F(ab) <sup>b</sup> quimérico	4250	$5,9 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^4$	0,91
F(ab)-12	3740	$6,3 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^4$	1,8

<sup>a</sup> A quantidade de ligação F(ab), em unidades de ressonância (RU), foi medida empregando-se um sistema BIACore™ quando dois µg de F(ab) foram injetados sobre um *chip* contendo 2480 RU de VEGF imobilizado. Os cinéticos fora de faixa ( $k_{off}$ ) foram medidos saturando-se o *chip* com F(ab) e então monitorando a dissociação após a transferência para o tampão. Os cinéticos em taxa ( $k_{on}$ ) foram medidos empregando-se duas vezes as diluições seriais de F(ab). A constante de

dissociação de equilíbrio  $K_d$ , foi calculada como  $k_{off}/k_{on}$ .

<sup>b</sup> F(ab) quimérico é um F(ab) quimérico com domínios VL e VH de murino fundidos em domínios pesados de CL e CH1 humanos.

[00193] Os mAbs de comprimento natural foram construídos fundindo-se os domínios VL e VH do F(ab) quimérico e F(ab)-12 variante aos domínios constantes de cadeia leve k humana e cadeia pesada IgG1 humana. O 12-IgG1 completo (F(ab)-12 fundido ao IgG1 humano) exibiu ligação que foi 1,7 vezes mais fraca do que o IgG1 quimérico (Tabela 4). Igualmente o 12-IgG1 e o IgG1 quimérico liga ligeiramente menos poço do que o mAb A4.6.1 de murino original (Tabela 4).

**TABELA 4:** Ligação de Variantes IgG Anti-VEGF a VEGF<sup>a</sup>

Variante	Média	S.D.	N
chlg1	1,0		2
murlg1 <sup>c</sup>	0,759	0,001	2
12-iGg1 <sup>d</sup>	1,71	0,03	2

<sup>a</sup> As variantes IgG anti-VEGF foram incubadas com VEGF biotinilado e então transferidas para placas ELISA revestidas com KDR-IgG (Park e outros, (1994), supra).

<sup>b</sup> chlg1 é IgG1 quimérico com os domínios VL e VH de murino fundidos às cadeias pesadas CL e IgG1 humanas; o EC50 para chlg1 foi  $0,113 \pm 0,013 \mu\text{g/ml}$  ( $0,75 \text{ nM}$ ).

<sup>c</sup> murlg1 é muMAbVEGF A461 purificado de ascites.

<sup>d</sup> 12-IgG1 é F(ab)-12 de domínios VL e VH fundidos em cadeias pesadas CL e IgG1 humanos.

[00194] *Estudos Biológicos:* rhuMAb VEGF e muMAb VEGF A.4.6.1 foram comparados quanto a suas capacidades de inibir a proliferação de célula endotelial capilar bovina em resposta a uma concentração próxima maximamente eficaz

de VEGF (3 ng/ml). Conforme ilustrado na Figura 3, os dois MAbs foram essencialmente equivalentes, igualmente em potência e eficácia. Os valores ED50 foram respectivamente de  $50 \pm 5$  ng/ml e  $48 \pm 8$  ng/ml (~0,3 nM). Em ambos os casos 90% de inibição foram obtidos na concentração de 500 ng/ml (~3 nM). Nem o muMAb VEGF A.4.6.1 nem o rhuMAb VEGF tiveram qualquer efeito sobre a proliferação basal ou estimulada por bFGF de células endoteliais capilares, confirmado que a inibição é específica para VEGF.

[00195] Para determinar se tal equivalência ajusta-se também a um sistema *in vivo*, os dois anticorpos foram comparados quanto a suas capacidades para suprimir o desenvolvimento de células rhabdomyosarcoma A673 humana em camundongos nus. Estudos prévios mostraram que muMAb VEGF A.4.6.1 tem um efeito inibidor dramático neste modelo de tumor (Kim e outros. *Nature* 362: 841 - 844 (1993) e Borgström e outros. *Cancer Res.* 56: 4032 - 4039 (1996)). Como mostrado na Figura 4, em ambas as doses testadas (0,5 e 5 mg/kg), os dois anticorpos marcadamente suprimiram o desenvolvimento de tumor como estimado por medições de peso de tumor quatro semanas após a inoculação celular. As diminuições em peso de tumor comparado ao grupo de controle foram respectivamente 85% e 93% em cada dose nos animais tratados com muMAb VEGF A.4.6.1 verso 90% e 95% naqueles tratados com rhuMAb VEGF. Resultados similares foram obtidos com o MDA-MB 435 de linhagem celular de carcinoma de mama.

#### EXEMPLO 2

[00196] Neste exemplo, o A4.6.1 de anticorpo anti-VEGF de murino acima descrito foi humanizado por randomização de um pequeno grupo de resíduos de estrutura e por exibição monovalente da biblioteca resultante de moléculas de anticorpo sobre a superfície de fago filamentoso a fim de identificar as Sequências de estrutura de elevada afinidade via seleção com base na afinidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

[00197] *Construção de Vetor de Fagemídeo Anti-VEGF, pMB4-19:* O mAb A4.6.1 anti-VEGF de murino é descrito acima no Exemplo 1. A primeira variante Fab de hu2.0, A4.6.1 humanizado, foi construída por mutagênese direcionada ao sítio empregando-se um modelo contendo deoxiuridina de plasmídeo pAK2 (Carter e outros. Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A 89: 4285 - 4289 (1992)) cujos códigos para um fragmento Fd de cadeia leve V<sub>L</sub>kI-Ck<sub>1</sub> humano e cadeia pesada de V<sub>M</sub>III-C<sub>H</sub>γ<sub>1</sub> humano. As Sequências CDR A4.6.1 transplantadas foram escolhidas de acordo com a definição de Sequência de Kabat e outros, supra, exceto para CDR-H1 que incluiu resíduos 26 - 35. A Sequência de codificação Fab foi subclonada no vetor de fagemídeo phGHamg3 (Bass e outros. *Proteins* 8; 309 - 314 (1990) e Lowman e outros, *Bioquímica* 30: 10832 a 10838 (1991)). Esta construção, pMB4-19, codifica o hu2.0, A4.6.1 Fab humanizado inicial, com a extremidade C da cadeia pesada fundida precisamente à porção carboxila da proteína de revestimento de gene III M13. o pMB4-19 é similar em construção a pDH188, um plasmídeo previamente descrito para exibição monovalente de fragmentos Fab (Garrard e outros. *Biotechnology* 9: 1373 - 1377 (1991)). Diferenças notáveis entre pMB4-19 e pDH188 incluem um segmento de gene III M13 mais curto (códons 249 - 406) e uso de um códon de interrupção de âmbar imediatamente seguindo o fragmento Fd de cadeia pesada de anticorpo. Isto permite expressão de ambas as fusões de gene III de cadeia pesada segregada ou de cadeia pesada em cepas supressoras *supE* de *E. coli*.

[00198] *Expressão e Purificação de Fragmento Fab A4.6.1 Humanizado:* A cepa *E. coli* 34B8, um não supressor, foi transformada com fagemídeo pMB4-19, ou suas variantes. As colônias únicas foram desenvolvidas durante a noite a 37°C em 5 mL de 2YT contendo 50 µg/mL de carbenicilina. Estas culturas foram diluí-

das em 200 mL de meio AP5 (Change e outros. *Gene* 55: 189 - 196 (1987)) contendo 20 µg/mL de carbenicilina e incubadas durante 26 horas a 30°C. As células foram peletizadas a 4000 x g e congeladas a -20°C durante pelo menos duas horas. As células peletizadas foram então ressuspensas em 5 mL de 10 mM de Tris-HCl (pH 7,6) contendo 1 mM de EDTA, agitadas a 4°C durante 90 minutos e centrifugadas a 10.000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi aplicado a um 1 mL de coluna de sepharose de proteína G estreptocócica (Pharmacia) e lavado com 1 mL de 10mM de MES (pH 5,5). O fragmento Fab de ligação foi eluído com 2,5 ml de 100 mM de ácido acético e imediatamente neutralizado com 0,75 mL de 1M Tris-HCl, pH 8,0. As preparações Fab foram permutadas por tampão em PBS e concentradas empregando-se concentradores Centricon-30 (Amicon). As produções típicas de Fab foram ~1 mg/L de cultura, purificação de pós-proteína G. As amostras Fab purificadas foram caracterizadas por espectrometria de massa por eletropulverização, e as concentrações foram determinadas por análise de aminoácido.

[00199] *Construção da Biblioteca de Fagemid Fab Anti-VEGF:* A biblioteca de fagemid A4.6.1 humanizado foi construída por mutagênese direcionada ao sítio, de acordo com o método de Kunkel e outros. *Methods Enzymol.* 204: 125 - 139 (1991)). Um derivado de pMB4-19 contendo tripletos de interrupção TAA nos códons V<sub>11</sub> 24, 37, 67 e 93 foi preparado para uso como o modelo de mutagênese (todas as numerações de Sequência de acordo com Kabat e outros, supra). Esta modificação foi para prevenir subsequente contaminação do ambiente por Sequências tipo silvestre. Os códons alvejados para randomização foram 4 e 71 (cadeia leve) e 24, 37, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 93 e 94 (cadeia pesada).

[00200] A fim de randomizar os códons de cadeia pesada 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 93 e 94 com um oligonucleotídeo mutagênico único, dois oligonucleotí-

deos 126-mer foram primeiro pré-agrupados de fragmentos 60 e 66-mer por ligação enzimática assistida por modelo. Especificamente, 1,5 nmol de 'oligonucleótido 5'fosforilado 503-1 (5'-GAT TTC AAA CGT CGT NYT ACT WTT TCT AGA GAC AAC TCC AAA AAC ACA BYT TAC CTG CAG ATG AAC-3' (SEQ ID NO: 22)) ou 503-2 (5'-GAT TTC AAA CGT CGT NYT ACT WTT TCT TTA GAC ACC TCC GCA AGC ACA BYT TAC CTG CAG ATG AAC-3' (SEQ ID NO: 23)) foram combinados com 1,5 nmol de 503-3 (5'-AGC CTG CGC GCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT DYA ARG TAC CCC CAC TAT TAT GGG-3' (SEQ ID NO:24)) (códons randomizados sublinhados: N = A/G/T/C; W=A/T; B=G/T/C; D=G/A/T; R=A/G; Y=C/T). Então, 1,5 nmol de oligonucleotídeos padrão (5'-CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT CTG CAG GTA-3'(SEQ ID NO:25)), com Sequência complementar às extremidades 5'de 503-1/2 e a extremidade 3'de 503-3, foram adicionados para hibridizar a cada extremidade da junção de ligação. A ligase Taq (ligase termoestável de New England Biolabs) e o tampão foi adicionado, e a mistura de reação foi submetida a 40 ciclos de ciclagem térmica, (95°C 1,25 min; 50°C durante 5 minutos) a fim de girar o oligonucleotídeo padrão entre as junções ligadas e não ligadas. O produto de oligonucleotídeos 126-mer foram purificados em um gel de poliacrilamida TBE/uréia a 6% e extraído da poliacrilamida em tampão. Os dois produtos 126-mer foram combinados em relação equivalente, o etanol precipitado e finalmente solubilizados em 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA. O produto de oligonucleotídeo 126-mer misturado foi rotulado 504-01.

[00201] A randomização de códons de estrutura selecionada ( $V_L$  4, 71,  $V_H$  24, 37, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 93, 94) foi realizada em duas etapas. Primeiramente, a randomização de  $V_L$  foi obtida preparando-se três derivados adicionais do padrão pMB4-19 modificado. Os códons de estrutura 4 e 71 na cadeia leve foram substituídos individualmente ou em pares empregando-se os dois oligonucleotídeos mutagênicos 5'-GCT GAT ATC CAG TTG ACC CAG TCC CCG-3'(SEQ ID NO: 26)

5'-e TCT GGG ACG GAT TAC ACT CTG ACC ATC-3' (SEQ ID NO: 27). O padrão contendo deoxiuridina foi preparado de cada destes novos derivados. Junto com o padrão original, estas quatro construções codificadas para cada das quatro possíveis combinações de Sequência de estrutura de cadeia leve (Tabela 5).

[00202] Os oligonucleotídeos 504-1, uma mistura de dois oligonucleotídeos 126-mer (veja acima), e 5'-CGT TTG TCC TGT GCA RYT TCT GGC TAT ACC TTC ACC AAC TAT GGT ATG AAC TGG RTC CGT CAG GCC CCG GGT AAG-3' (SEQ ID NO: 28) foram empregados para randomizar os códons de estrutura de cadeia pesada empregando-se cada dos quatro padrões há pouco descritos. As quatro bibliotecas foram eletroporados em células Blue XL-1 de *E. coli* (Stratagene) e combinadas. O número total de transformantes independentes foi estimado a > 1,2 x 10<sup>8</sup>, aproximadamente 1.500 vezes maior do que o número máximo de Sequências de DNA na biblioteca.

[00203] Diversos sistemas foram desenvolvidos para a exibição funcional de fragmentos de anticorpos sobre a superfície de fago filamentoso. Winter e outros, *Ann. Rev. Immunol.* 12.433 (1994). Estes incluem a exibição de Fab ou fragmentos Fv (scFv) de cadeia única como fusões a qualquer das proteínas de revestimento do gene III ou gene VIII de bacteriófago M13. O sistema selecionado aqui é similar àquele descrito por Garrard e outros, *Biotechn*, 9, 1373 (1991) em que um fragmento Fab é monovalentemente exibido como uma fusão de gene III (Figura 7). Este sistema tem dois aspectos notáveis. Em particular, os fragmentos Fab, ao contrário do scFvs, não têm nenhuma tendência a formar espécies diméricas, a presença dos quais pode prevenir a seleção dos aglutinantes mais firmes, devido aos efeitos de avidez. Adicionalmente, a monovalência da proteína exibida elimina uma segunda fonte potencial de efeitos de avidez que de outra maneira resultaria da presença de múltiplas cópias de uma proteína em cada partícula de fagemídeo. Bass e Wells, *Proteins* 8; 309 (1990) e Lowman e outros,

*Biochemistry* 30: 10832 (1991).

[00204] As partículas de fagemídeo exibindo os fragmentos Fab A4.6.1 humanizados foram propagadas em células Blue XL-1 de *E. coli*. Resumidamente, as células abrigando a construção pMB4-19 randomizada foram desenvolvidas durante a noite a 37°C em 25 mL de meio 2YT contendo 50 µg/mL de carbenicilina e aproximadamente  $10^{10}$  de fago auxiliar M13K07 (Vieira & Messing, *Methods Enzymol.* 153: 3 - 11 (1987)). Os estoques de fagemídeo foram purificados de sobrenadantes de cultura por precipitação com uma solução salina de polietilen glicol, e ressuspenso em 100 µL de PBS ( $\sim 10^{14}$  fagemídeo/mL).

[00205] *Seleção de Variantes Fab A4.6.1 Humanizadas:* O VEGF<sub>121</sub> purificado (100 µL a 10 µg/mL em PBS) foi revestido sobre um poço de placa de microtítulo durante a noite a 4°C. A solução de revestimento foi descartada e este poço, em adição a um poço não revestido, foi bloqueado com 6% de leite desnatado durante uma hora e lavado com PBS contendo 0,05% de TWEEN 20™ (detergente). Então, 10 µl de estoque de fagemídeo, diluídos a 100 µL com 20 mM de Tris (pH 7,5) contendo 0,1% de BSA e 0,05% de TWEEN 20™, foram adicionados a cada poço. Após duas horas as células foram lavadas e o fago de ligação eluído com 100 µl de 1 M de glicina (pH 2,0), e neutralizado com 25 µL de 1M Tris pH 8,0. Uma alíquota deste foi empregada para titular a quantidade de fago eluída. O fago remanescente eluído do poço revestido por VEGF foi propagado para uso no próximo ciclo de seleção. Um total de 8 ciclos de seleção foi realizado e após este tempo 20 clones individuais foram selecionados e seqüenciados (Sanger e outros. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463 - 5467 (1977)).

[00206] *Determinação de Afinidades de Ligação de VEGF:* As taxas de associação ( $K_{on}$ ) e dissociação ( $k_{off}$ ) constantes para ligação de variantes Fab A4.6.1 humanizadas para VEGF<sub>121</sub> foram medidas por ressonância de plasmônio de super-

fície (Karlsson e outros. *J. Immun. Methods* 145: 229 - 240 (1991)) em um instrumento Pharmacia BIACore. O VEGF<sub>121</sub> foi covalentemente imobilizado sobre o *chip* biosensor via grupos amino primários. A ligação de variantes Fab A4.6.1 humanizadas foi medida pelas seguintes soluções de Fab em PBS/0,05% de TWEEN 20<sup>TM</sup> sobre o *chip* em uma taxa de fluxo de 20 µl/min. Segundo cada medição de ligação, o Fab residual foi retirado do ligante imobilizado por lavagem com 5 µl de 50 mM aquoso de HCl a 3 µL/min. Os perfis de ligação foram analisados por regressão não-linear empregando-se um modelo de ligação monovalente simples (software BIAsimulation v2.0; Pharmácia).

#### RESULTADOS:

[00207] *Construção de A.4.6.1 Humanizado:* Um fragmento Fab A4.6.1 humanizado inicial foi construído (hu2.0, Figuras 5A e 5B), no qual os CDRs foram enxertados sobre uma estrutura V<sub>L</sub>kI-V<sub>H</sub>III humana. Todos os outros resíduos em hu2.0 foram mantidos como a Sequência humana. A ligação desta variante ao VEGF foi tão fraca quanto para ser não detectável. Com base na afinidade relativa de outras variantes A4.6.1 humanizadas de ligação fraca, o K<sub>D</sub> para ligação de hu2.0 foi estimado a > 7 µM. Isto contrasta com uma afinidade de 1,6 nM para uma construção Fab quimérica consistindo nos domínios V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub> intactos do murino A4.6.1 e domínios constantes humanos. Dessa maneira a ligação de hu2.0 ao VEGF foi pelo menos 4000 vezes reduzido relativo à quimera.

[00208] *Projeto de Biblioteca de Anticorpo:* O grupo de alterações de estrutura para a Sequência de estrutura humana aqui é mostrado na Tabela 5 e Figura 6:

**TABELA 5:** Importantes Resíduos de Estrutura Chave para Ligação de Antígeno e Alvejados para Randomização.

Resíduo de estrutura		Resíduo de consenso de V <sub>L</sub> , V <sub>H</sub> III humano	Resíduo de A4.6.1 de Murino	Randomização <sup>a</sup> .
V <sub>L</sub>	4	Met	Met	Met, Leu
	71	Phe	Tyr	Phe, Tyr
V <sub>H</sub>	24	Ala	Ala	Ala, Val, Thr
	37	Val	Val	Val, Ile
	67	Phe	Phe	Phe, Val, Thr, Leu, Ile, Ala
	69	Ile	Phe	Ile, Phe
	71	Arg	Leu	Arg <sup>b</sup> , Leu <sup>b</sup>
	73	Asp	Thr	Asp <sup>b</sup> , Thr <sup>b</sup>
	75	Lys	Ala	Lys <sup>b</sup> , Ala <sup>b</sup>
	76	Asn	Ser	Asn <sup>b</sup> , Ser <sup>b</sup>
	78	Leu	Ala	Leu, Ala, Val, Phe
	93	Ala	Ala	Ala, Val, Leu, Ser, Thr
	94	Arg	Lys	Arg, Lys

<sup>a</sup> Diversidade de aminoácido em biblioteca de fagemídeo.

<sup>b</sup> V<sub>H</sub> 71, 73, 75, 76 randomizado para produzir o V<sub>H</sub>III tetrad todo de murino (L71/T73/A75/S76) ou todo humano (R71/D73/K75/N76).

[00209] Uma relação em planejamento da biblioteca de fagemídeo A4.6.1 humanizado foi que os resíduos alvejados para randomização foram amplamente distribuídos através das Sequências V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub>. As limitações em comprimento de oligonucleotídeos sintéticos requer que randomização simultânea de cada destas posições de estrutura possa apenas ser obtida por meio do uso de múltiplos oligonucleotídeos. Entretanto, como o número total de oligonucleotídeos au-

menta, a eficiência de mutagênese diminui (isto é, a proporção de mutantes obtidos que incorporam a Sequência derivada de todos os oligonucleotídeos mutagênicos). Para evitar este problema, dois aspectos foram incorporados na construção da biblioteca. O primeiro foi para preparar quatro diferentes codificações padrão de mutagênese para cada das possíveis combinações de estrutura  $V_L$ . Isto foi simples para fazer suposta a diversidade limitada da estrutura de cadeia leve (apenas 4 diferentes Sequências), porém foi benéfico pelo fato de que eliminou a necessidade de dois oligonucleotídeos da estratégia de mutagênese. Em segundo lugar, dois oligonucleotídeos de base 126 foram pré-agrupados de fragmentos sintéticos menores. Isto tornou possível a randomização de códons  $V_H$  67, 69, 71, 73, 75, 76, 93 e 94 com um oligonucleotídeo longo único, em vez de dois outros menores. A estratégia de mutagênese de randomização final portanto empregou apenas dois oligonucleotídeos simultaneamente sobre quatro diferentes padrões.

[00210] *Seleção de Fab's A4.6.1 Humanizado de Ligação Firme:* As variantes da biblioteca de fagemídeo Fab A4.6.1 humnizada foram selecionadas com base na ligação ao VEGF. O enriquecimento de fagemídeo funcional, conforme medido comparando-se os titulares para fago eluído de um revestido de VEGF verso poço de placa de microtítulo não revestido, aumentado para o sétimo ciclo de autoclave. Após um ciclo adicional de classificação, 20 clones foram seqüenciados para identificar os resíduos de estrutura preferidos selecionados a cada posição randomizada. Estes resultados, sumarizados na Tabela 6, revelaram forte consenso no meio dos clones selecionados. Dez fora dos vinte clones tiveram a Sequência de DNA idêntica, designada hu2.10. Das treze posições de estrutura randomizadas, oito substituições foram selecionadas em hu2.10 ( $V_L$  71;  $V_H$  37, 71, 73, 75, 76, 78 e 94). Interessantemente, os resíduos  $V_H$  37 (Ile) e 78 (Val)

foram selecionados nenhum como a Sequência V<sub>HIII</sub> humana ou A4.6.1 de murino. Este resultado sugere que algumas posições de estrutura podem beneficiar-se do estendimento da diversidade além das Sequências de estrutura humana alvejada e de murino parental.

**TABELA 6:** Sequências selecionadas da Biblioteca Fab de Fagemídeo A4.6.1 Humanizado.

Variante	Substituições de resíduo														
	V <sub>L</sub>	V <sub>H</sub>	4	71	24	37	67	69	71	73	75	76	78	93	94
A4.6.1 de murino	M	Y	A	V	F	F	L	T	A	S	A	A	K		
hu2.0 (enxerto de CDR)	M	E	A	V	F	I	R	N	K	N	L	A	R		
Clones selecionados de fago															
hu2.1 (2)	-	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	-	V	-	K	
hu2.2 (2)	L	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	-	V	-	K	
hu2.6 (1)	L	-	-	I	T	-	L		T	A	S	V	-	K	
hu2.7 (1)	L	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	V	-	K	
hu2.10 (10)	-	Y	-	I	-	-	L		T	A	S	V	-	K	

As diferenças entre os anticorpos hu2.0 e A4.6.1 de murino são sublinhadas. A quantidade de identificações de clones idênticos para cada Sequência selecionada de fago é indicada em parênteses.

Os traços nas Sequências de clones selecionados de fago indicam seleção da Sequência de estrutura  $V_L$ - $kI$ - $V_H$ -III humana (isto é, como em hu2.0).

[00211] Existiam quatro outras Sequências aminoácidas únicas entre os dez clones remanescentes analisados: hu2.1, hu2.2, hu2.6 e hu2.7. Todos estes clones, em adição ao hu2.10, continham substituições de estrutura idêntica nas posições  $V_H$  37 (Ile), 78 (Val) e 94 (Lys), porém mantinham a Sequência de consenso  $V_H$ -III humana nas posições 24 e 93. Quatro clones perderam a Sequência de codificação de cadeia leve e não ligaram VEGF quando testados em um teste ELISA de fago (Cunningham e outros. *EMBO J.* 13: 2508 - 251 (1994)). Tais artefatos podem freqüentemente ser minimizados reduzindo-se a quantidade de ciclos ou propagando-se as bibliotecas em meio sólido.

[00212] *Afinidade de Expressão e Ligação de Variantes A4.6.1 Humanizadas:* As variantes selecionadas de fago hu2.1, hu2.2, hu2.6, hu2.7 e hu2.10 foram expressas em *E. coli* empregando-se os frascos agitados e os fragmentos de Fab foram purificados de extratos periplásmicos por cromatografia de afinidade de proteína G. As produções recuperadas de Fab para estes cinco clones variaram de 0,2 (hu2.6) a 1,7 mg/l (hu2.1). A afinidade de cada destas variantes para antígeno (VEGF) foi medida pela ressonância de plasmônio de superfície em um instrumento BIACore (Tabela 7). A análise destes dados de ligação revelou que o clone de consenso hu2.10 possuía a afinidade mais elevada para VEGF fora as cinco variantes testadas. Portanto, a biblioteca de fagemídeo Fab foi seletivamente enriquecida quanto ao clone de ligação mais firme. O  $K_D$  calculado para hu2.10 foi 55 nM, pelo menos 125 vezes mais firme do que para o hu2.0 que não contém nenhuma alteração de estrutura ( $K_D > 7 \mu M$ ). As outras quatro variantes selecionadas todas exibiram ligação mais fraca ao VEGF, variando abaixo de um  $K_D$  de 360 nM para o mais fraco (hu2.7). Interessantemente, o  $K_D$  para o hu2.6, 67 nM, foi apenas marginalmente mais fraco do que aquele do hu2.10 e ainda

apenas uma cópia deste clone foi encontrada entre os 20 clones seqüenciados. Isto é possível devido a um nível mais baixo de expressão e exibição, como foi o caso quando expressando o Fab solúvel desta variante. Entretanto, a despeito da taxa de expressão menor, esta variante é útil como um anticorpo humanizado.

**TABELA 7:** Afinidade de Ligação de VEGF de Variantes Fab A4.6.1 Humanizadas

Variante	$K_{on} M^{-1}s^{-1}/10^4$	$K_{off} 10^4s^{-1}$	$k_D nM$	$K_p(A4.6.1)$ $K_p(\text{mut})$
quimera A4.6.1 hud 2,0	5,4 ND	0,85 ND	1,6 >7000**	>4000
<b>clones selecionados de fago</b>				
hu2.1	0,70	18	260	170
hu2.2	0,47	16	340	210
hu2.6	0,67	4,5	67	40
hu2.7	0,67	24	360	230
hu2.10	0,63	3,5	55	35
*hu2.10V	2,0	1,8	9,3	5,8

hu2.10V = hu2.10 com mutação  $V_L$  Leu → Val

Erros estimados nas medições de ligação Blacore são  $+/- 25\%$ .

\*\* Muito fraco para medir; estimado de ligação inferior.

[00213] *Desenvolvimento Adicional de hu2.1 de Variante Humanizada:* A despeito do grande desenvolvimento em afinidade de antígeno sobre a variante humanizada inicial, a ligação de hu2.10 ao VEGF foi ainda 35 vezes mais fraca do que um fragmento de Fab químérico contendo os domínios  $V_L$  e  $V_H$  de A4.6.1 de murino. Esta diferença considerável sugere que outra otimização da estrutura humanizada deve ser possível por meio de mutações adicionais. Dos resíduos

Vernier identificados por Foote & Winter *J. Mol. Biol.* 224: 487 - 499 (1992), apenas resíduos V<sub>L</sub>46, V<sub>H</sub>2 e V<sub>H</sub>48 diferiram no A4.6.1 verso estrutura V<sub>L</sub>kI-V<sub>H</sub>III humana (Figs. 5A e 5B), porém não foram randomizadas biblioteca fagemídea. Um modelo molecular do fragmento Fv A4.6.1 humanizado mostrou que os V<sub>L</sub> 46 situam-se na interface V<sub>L</sub> - V<sub>H</sub> e poderiam influenciar a conformação de CDR-H3. Além disso, este aminoácido é quase sempre leucina na maioria das estruturas V<sub>L</sub>k (Kabat e outros, supra), porém é valina em A4.6.1. Portanto, uma substituição Leu → Val foi feita nesta posição no fundamento de hu2.10. A análise de cinéticos de ligação para esta nova variante, hu2.10V, indicou um outro desenvolvimento de 6 vezes no K<sub>D</sub> para a ligação de VEGF, demonstrando a importância de valina na posição V<sub>L</sub>46 no anticorpo A4.6.1. O K<sub>D</sub> para hu2.10V (9,3 nM) foi dessa maneira dentro de 6 vezes aquele da quimera. Em contraste a V<sub>L</sub>46, nenhum desenvolvimento na afinidade de ligação de hu2.10 foi observado para substituição de ou V<sub>H</sub>2 ou V<sub>H</sub>48 com o resíduo correspondente de A4.6.1 de mu-rino.

### EXEMPLO 3

[00214] Neste exemplo, a randomização CDR, maturidade de afinidade por exibição de fago Fab monovalente, e combinação cumulativa de mutações foram empregadas para realçar a afinidade de um anticorpo anti-VEGF.

[00215] *Construção de pY0101 de Anticorpo Humanizado:* O vetor phMB4-19-1.6 de anticorpo demonstrado pelo fago (veja Figuras 8A-E) foi empregado como uma origem. Nesta construção, o anti-VEGF é expresso como um fragmento Fab com sua cadeia pesada fundida à extremidade N do g3p truncado. Igualmente as cadeias leves e pesadas estão sob o controle de promotor phoA com uma Sequência de sinal stII a montante para segregação no periplasma. As mutações de ponto externas às regiões CDR foram feitas por mutagênese direcionada ao sítio para melhorar a afinidade quanto a VEGF com oligonucleotídeos HL-242, HL-243,

HL-245, HL-246, HL-254, HL-256, e HL-257 conforme mostrado na Tabela 8 abaixo:

TABELA 8: Oligos para Mutações Direcionadas.

Oligo nú- mero	Região	Substituição/ Comentários	Sequência
HL- 242	VL	M4L	5'GATATCCAGTTGACCCAGTCCCCG-3' (SEQ ID NO:29)
HL- 243	VL	L46V	5'GCTCCGAAAGTACTGATTAC-3' (SEQ ID NO:30)
HL- 245	VH	CDR-7	5'CGTCGTTCACTTTCTGCAGACACCTCCAGCAA-CACAGTATACTGCAGATG-3' (SEQ ID NO:31)
HL- 246	VH	R98K	5'-CTATTACTGTGCAAAGTACCCCCAC-3' (SEQ ID NO:32)
HL- 254	VL	Y71F	5'-GGGACGGATTCACTCTGACCATC-3' (SEQ ID NO:33)
HL- 256	VH	I37V	5'-GGTATGAACTGGGTCCGTAGGCC-3' (SEQ ID NO:34)
HL- 257	VH	CDR-7 A72L S76K N77S	5'-CGTCGTTCACTTTCTTAGACACCTCCAAAAG-CACAGC ATACCTGCAGATGAA

[00216] A variante resultante foi denominada Y0101 (Figuras 9A e 9B).

[00217] *Construção da Primeira Geração de Bibliotecas de Fago de Anticorpo:*

Para prevenir a contaminação por Sequência tipo silvestre, os padrões com o códon de interrupção TAA nos sítios alvejados para randomização foram preparados e empregados para as bibliotecas de construção por mutagênese direcionada ao sítio com oligonucleotídeos empregando o códon NNS degenerado

(onde N é uma mistura equivalente de A, G, C e T ao mesmo tempo que S é uma mistura de G e C) para mutagênese de saturação. VL1 e VH3 foram escolhidos como candidatos potenciais para realce da afinidade (Figs 9A e B). Dentro dos CDRs, duas bibliotecas foram construídas do modelo pY0101. VL1 foi mutado empregando-se os oligonucleotídeos de padrão de interrupção HL-248 e HL-249 (Tabela 9) e oligonucleotídeos de biblioteca HL-258 e HL-259 (Tabela 10). Similarmente, três bibliotecas foram construídas para VH3 empregando-se os oligonucleotídeos de padrão de interrupção HL-250, HL-251, e HL-252 (Tabela 9), e oligonucleotídeos de biblioteca HL-260, HL-261, e HL-262 (Tabela 10). A construção da biblioteca é sumarizada nas Tabelas 9 e 10 abaixo.

TABELA 9: Oligos padrão para Mutagênese.

Oligo Número	Região - Comentários	Sequência
HL-248	VL1	5'GGGTCACCATCACCTGCTAACATAATAATAAAAGCAACTATT-TAAACTGG-3' (SEQ ID NO:36)
HL-249	VL1	5'GCGCAAGTCAGGATTTAACATAATAATAATGGTATCAACAGAACCCAGG-3' (SEQ ID NO:37)
HL-250	VH3	5'-GTCTATTACTGTGCAAAGTAATAACACTAATAAGGGAGCAG-CCACTGG-3' (SEQ ID NO:38)
HL-251	VH3	5'-GGTACCCCCACTATTATAATAATAATGGTATTCGACG-TCTGGGG-3' (SEQ ID NO:39)
HL-252	VH3	5'-CACTATTATGGGAGCAGCCACTAATAATAAGTCTGGT-CAAGGAACCCTG-3' (SEQ ID NO:40)
HL-263	VH1	5'-TCCTGTGCAGCTTCTGGCTAACATTCTAACATAAGGTATGAAC-TGGGTCCG-3' (SEQ ID NO:41)

HL-264	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTAACTAATAATAAGGTTAACCGACCTA-TGCTGCGG-3' (SEQ ID NO:42)
YC-80	VH3	5'-CTGTGCAAAGTACCCGTAATATTAATAATAATAACACTGGTATT-CGAC-3' (SEQ ID NO:43)
YC-100	CDR7	5'-CGTTTCACTTTTCTTAAGACTAATCCAAATAAACAGCATACTGC-CAG-3' (SEQ ID NO:44)
YC-102	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTAAATAATAAGGTGAACCGACC-TATG-3' (SEQ ID NO:45)

**TABELA 10:** Oligos Aleatórios para Construção de Biblioteca.

Oligo Número	Região Comentário	Sequência
HL-258	VL1	5'-GGGTCACCATCACCTGCNNSGCANNNSNNNSNNNSAGCACTATT-TAAACTGG-3' (SEQ ID NO:46)
HL-259	VL1	5'-GCGCAAGTCAGGATATTNNSNNSNNNSNNNSTGGTATCAACA-GAAACCAGG-3' (SEQ ID NO:47)
HL-260	VH3	5'-GTCTATTACTGTCAAAGNNSNNSCACNNNSNNSGGGAGCAGCCAC-TGG-3' (SEQ ID NO:48)
HL-261	VH3	5'-TACCCCCACTATTATNNSNNSNNNSNNSTGGTATTTCGACG-TCTGGGG-3' (SEQ ID NO:49)
HL-262	VH3	5'-CACTATTATGGGAGGCAGGCCACNNSNNSNNNSNNSGTCTGGGT-CAAGGAACCTG-3' (SEQ ID NO:50)
HL-265	VH1	5'-TCCTGTGCAGCTTCTGGCNNSNNSTCNNSNNSNNSGGTATGAAC-TGGGTCCG-3' (SEQ ID NO:51)
HL-266	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTAAACNNSNNSNNSGGTNNSCCGACCTA-TGCTGCGG-3' (SEQ ID NO:52)

YC-81	VH3	5'-CTGTGCAAAGTACCCGNSTATNNNSNNNSNNSCACTGGTATT-CGAC-3' (SEQ ID NO:53)
YC-101	CDR7	5'-CGTTCACTTTCTNNSGACNNSTCAAANNSACAGCATACTG-CAG-3' (SEQ ID NO:54)
YC-103	VH2	5'-GAATGGGTTGGATGGATTNNNSNNNSNNSGGTGAACCGACC-TATG-3' (SEQ ID NO:55)

[00218] Os produtos de reações de mutagênese aleatória foram eletro-examinados em células *E. coli* Blue de XL1 (Stratagene) e amplificadas pelo desenvolvimento 15 a 16 horas com o fago auxiliar M13K07. A complexidade de cada biblioteca, variando de  $2 \times 10^7$  a  $1,5 \times 10^8$ , foi estimada com base em chapeamento da transformação inicial sobre placas de carbenicilina.

[00219] *Seleções de Afinidade Inicial:* Para cada ciclo de seleção, aproximadamente  $10^9$  -  $10^{10}$  fago foram analisados quanto à ligação a placas (Nunc Maxisorp de poço 96) revestidas com 2 µg/mL de VEGF (recombinante; versão 9 - 109 de resíduo) em 50 mM de tampão de carbonato, pH 9,6 e bloqueados com 5% de leite instantâneo em 50 mM de tampão de carbonato, pH 9,6. Após 1 - 2 horas de ligação em temperatura ambiente, na presença de 0,5% de albumina de soro bovino e 0,05% de TWEEN 20™ em PBS, a solução de fago foi removida, e a placa foi lavada dez vezes com PBS/TWEEN™ (0,05% de TWEEN 20™ em tampão PBS). Tipicamente, para selecionar quanto a variantes de afinidade com taxas de dissociação mais lentas, as placas foram incubadas com tampão PBS/TWEEN™ durante um período de tempo que progressivamente prolongou-se para cada ciclo de seleção (de 0 minutos para o primeiro ciclo, a 3 horas para o nono ciclo de seleção). Após o tampão PBS/TWEEN™ ser removido, os fagos remanescentes foram eluídos com 0,1 M HCl e imediatamente neutralizados com 1/3 de volume de 1M de Tris, pH 8,0. Os fagos eluídos foram propagados infectando-se as células de *E. coli* Blue de XL-1 (Stratagene) para o próximo ciclo de seleção.

[00220] Os dados de seqüenciamento revelaram que ambas as bibliotecas VL1, mesmo após o ciclo oitavo/nono de classificação, permaneceram diversas, tolerando vários tipos de resíduos nos sítios de randomização. Em contraste, as bibliotecas VH3 mantiveram apenas resíduos do tipo silvestre ou tiveram substituições muito conservadoras. Isto sugere que o VL1 foi mais exposto ao solvente e situa-se fora da interface de ligação. Em contraste, VH3 não exibiu substituições de cadeia lateral dramaticamente diferentes, e portanto deveria ser mais intimamente envolvido em ligação de antígeno.

[00221] *Teste ELISA de Fago de Afinidades de Ligação:* De cada destas bibliotecas, os clones representativos (aqueles representados por Sequências abundantes) foram testados quanto a suas afinidades relativas àquela de pY0101 de clone parental em um teste ELISA de fago. Em um tal teste, os fagos foram primeiro consecutivamente diluídos para determinar um título de saturação fracional que foi então mantido constante e empregado para incubar com concentrações de variação de VEGF (iniciando em 200 nm a 0 nM) em solução. A mistura foi então transferida sobre placa pré-revestida com VEGF (2 µg/mL) e bloqueada com 5% de leite instantâneo, e permitido equilibrar durante 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, a solução de fago foi removida e os fagos de ligação remanescente foram detectados com uma solução de anticorpo anti-fago de coelho misturados com conjugado anti-coelho de cabra de peroxidase de rábano-silvestre. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, a placa foi desenvolvida com um substrato cromogênico, o-fenilenodiamina (Sigma). A reação foi interrompida com a adição de ½ de volume de 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A densidade ótica a 492 nm foi medida em uma leitora de placa espectrofotométrica.

[00222] Embora todos os clones selecionados destas cinco bibliotecas exibiram ou afinidades mais fracas ou similares do que aquela pY0101 do tipo silvestre em teste ELISA de fago, uma variante particular (pY0192) de biblioteca HL-

258 exibiu uma vantagem aparente (cerca de 10 vezes) no nível de expressão ou exibição de fago relativa a pY0101. Este clone continha mutações S24R, S26N, Q27E, D28Q, e I29L na região VL (Figura 9A). Além disso, esta variante foi constatada ter uma mutação espúria, M34I, em VH. Esta variante não exibiu nenhuma diferença significante em afinidade de ligação ao VEGF quando comparado com a variante pY0101. Para melhorar o nível de exibição de Fab sobre o fago, e a relação de sinal para ruído para testes ELISA de fago, as substituições correspondentes em pY0192 em VL1 foram incorporadas no fundamento modelo para construção de ambos mutantes Ala CDR e a segunda geração de bibliotecas anti-VEGF.

[00223] *Varredura de Ala dos CDRs de Anti-VEGF:* Para determinar os energéticos contribuídos por cada um dos aminoácidos nas regiões CDR e dessa maneira selecionar melhor os resíduos alvo para randomização, as regiões CDR foram analisadas substituindo-se a alanina para cada resíduo. Cada mutante Ala foi construído empregando-se a mutagênese direcionada ao sítio com uma codificação de oligonucleotídeo sintético para a substituição de alanina específica. Onde Ala foi o resíduo tipo silvestre, Ser foi substituído para testar o efeito de uma substituição de cadeia lateral. Os clones de fago tendo uma única mutação Ala foram purificados e testados em ELISA quanto ao fago conforme acima descrito. Os resultados da varredura de Ala demonstraram que a substituição de Ala em várias posições pode ter um efeito, variando de 2 a > 150 vezes as reduções, em afinidade de ligação de antígeno comparado ao pY0192. Além disso, confirmou-se uma observação prévia de que VH3, porém não VL1, foi envolvido em ligação de antígeno. Os resultados da varredura de Ala de CDR são sumarizados na Tabela 11 abaixo.

**TABELA 11:** Afinidades de VEGF Relativas de Variantes Fab de Varredura de Ala

Resíduo VL	IC50 (mutação)	Resíduo VH	IC50 (mutação)
	IC50 (peso)		IC50 (peso)
R24A	1	G26A	2
A25S	1	Y27A	34
N26A	1	T28A	1
E27A	1	F29A	16
Q28A	1	T30A	1
L29A	1	N31A	>150
S30A	2	Y32A	>150
N31A	2	G33A	6
Y32A	2	I34A	6
L33A	2	N35A	66
N34A	4		
		W50A	>150
F50A	1	I51A	4
T51A	1	N52A	>150
S52A	1	T53A	9
S53A	1	Y54A	9
L54A	1	T55A	4
H55A	1	G56A	1
S56A	1	E57A	2
		P58A	1
Q89A	4	T59A	3
Q90A	3	Y60A	2
Y91A	14	A61S	1
S92A	1	A62S	1

T93A	1	D63A	1
V94A	2	F64A	1
P95A	3	K65A	1
W96A	>150	R66A	1
T97A	1		
		Y99A	>150
		P100A	38
		H101A	4
		Y102A	4
		Y103A	5
		G104A	2
		S105A	1
		S106A	>150
		H107A	2
		W108A	>150
		Y109A	19
		F110A	25
		D111A	2

Todas as variantes são no fundamento de pY0192 ("peso"; veja as Figuras 9A - B). Os IC50's foram determinados em um teste ELISA de fago competitivo.

[00224] Os efeitos maiores de substituições Ala são vistos em CDRs H1, H2, e H3, incluindo Y27A (34 vezes a redução em afinidade), N31A, Y32A, W50A, N52A, Y99A, S106A e W108A (cada > 150 vezes a redução); N35A (66 vezes a redução), P100A (38 vezes a redução) e F110A (25 vezes a redução). Ao contrário, apenas uma substituição VL teve um grande impacto sobre a afinidade de ligação, W96A (> 150 vezes a redução). Estes resultados apontam para os três CDRs VH como os determinantes energéticos principais de ligação de Fab ao VEGF, com alguma

contribuição de VL3.

[00225] *Projeto de Bibliotecas de Mutação CDR de Segunda Geração:* Duas bibliotecas adicionais que randomizaram existindo resíduos em anti-VEGF versão Y0192 foram designadas com base na inspeção da estrutura de cristal. No VH2, os resíduos 52 a 55 foram randomizados porque eles situam-se dentro da interface de ligação com o VEGF. Uma região adicional do Fab, denominada “CDR7” (veja Figura 10B), foi também alvejada para randomização porque diversos resíduos neste loop, ao mesmo tempo que não contactando o VEGF, têm contactos com os loops VH do anticorpo. Estes representaram sítios potenciais quanto ao desenvolvimento de afinidade por meio de efeitos secundários sobre os resíduos de interface. Os resíduos L72, T74 e S77 foram randomizados nesta biblioteca CDR7.

[00226] Também com base na estrutura de cristal, uma das bibliotecas CDR originais foi reconstruída para retestar o potencial junto à maturidade de afinidade no CDR VH1. Os resíduos 27, 28 e 30 - 32 foram randomizados empregando-se o novo fundamento Y0192.

[00227] *Seleções de Segunda Geração de Bibliotecas Anti-VEGF:* Com base nos resultados de varredura de Ala, bem como a estrutura de cristal do complexo (F(ab)-12) de anticorpo de antígeno, um total de dezessete bibliotecas foram construídas empregando-se o padrão pY0192 e os oligonucleotídeos de padrão de interrupção (que codifica para um códon de interrupção nos sítios alvejados para randomização) YC-80, YC-100, YC-102, HL-263, e HL-264 (Tabela 9 acima). Os oligonucleotídeos de randomização correspondentes (que empregam NNS nos sítios alvejados para randomização) foram YC81, YC-101, YC-103, HL-265, e HL-266 (Tabela 10 acima). Os transformantes resultantes produziram bibliotecas com complexidades variando de  $6 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  que sugerem que as bibliotecas foram comprehensivas em abranger todas as variantes possíveis. As bibliotecas

de fago foram classificadas para 7 - 8 ciclos empregando as condições conforme descrito na Tabela 12 abaixo.

**TABELA 12:** Condições para Seleções Secundárias de Variantes Fab

Ciclo de Seleção	Tempo de Incubação (hora)	Solução de Incubação	Temperatura de Incubação (°C)
1	0	0	temperatura ambiente
2	1	tampão ELISA	temperatura ambiente
3	2	1 µM VEGF/ELISA	temperatura ambiente
4	18	1 µM VEGF/ELISA	temperatura ambiente
5	37	1 µM VEGF/ELISA	temperatura ambiente
6	17 h @ temperatura ambiente/30 h @ 37°C	1 µM VEGF/ELISA	temperatura ambiente 37°
7	63	1 µM VEGF/ELISA	37°C
8	121	1 µM VEGF/ELISA	37°C

[00228] O tampão ELISA conteve 0,5% de albumina de soro bovino e 0,05% de TWEEN 20™ em PBS. O VEGF foi incluído no tampão de incubação para minimizar a religação de fagos ao VEGF revestido sobre a superfície da placa. A classificação destas bibliotecas produziu enriquecimentos de fago durante 7 a 8 ciclos de seleção.

[00229] *Testes ELISA de Fago de Clones de Segunda Geração:* Após ciclos de seleções, dez a vinte clones de cada biblioteca foram isolados de carbenicilina contendo placas acolhendo colônias *E. coli* (XL1) que foram infectadas com um

grupo de fago eluído. As colônias foram isoladas e desenvolvidas com fago auxiliar para obter DNA de filamento único para seqüenciamento. As substituições de CDR selecionadas para ligação mais favorável ao VEGF foram deduzidas das Sequências de DNA de clones de fagomídeo. Uma amostra de clones selecionados é mostrada na Tabela 13 abaixo.

**TABELA 13:** Sequências de Proteína de Variantes Anti-VEGF de Bibliotecas de Fago Fab de Segunda Geração

Variantes de biblioteca YC-81	
Nome	Sequência VH3 (resíduos 99 a 111)
Y0238-1	YPYYRGTSHWYFD (SEQ ID NO:56)
Y0238-2	YPYYINKSHWYFD (SEQ ID NO:57)
Y0238-3	YPYYYGTSHWYFD (SEQ ID NO:58)
Y0238-4	YPYYYNQSHWYFD (SEQ ID NO:59)
Y0238-5	YPYYIAKSHWYFD (SEQ ID NO:60)
Y0238-6	YPYYRDN SHWYFD (SEQ ID NO:61)
Y0238-7	YPYYWGTSHWYFD (SEQ ID NO:62)
Y0238-8	YPYYRQN SHWYFD (SEQ ID NO:63)
Y0238-9	YPYYRQSSH WYFD (SEQ ID NO:64)
Y0238-10	YPYYRNTSHWYFD (SEQ ID NO:65)
Y0238-11	YPYYKNTSHWYFD (SEQ ID NO:66)
Y0238-12	YPYYIERSHWYFD (SEQ ID NO:67)
Y0228-21	YPYYRNASHWYFD (SEQ ID NO:68)
Y0228-22	YPYYTTRSHWYFD (SEQ ID NO:69)
Y0228-23	YPYYEGSSH WYFD (SEQ ID NO:70)
Y0228-24	YPYYQRGH WYFD (SEQ ID NO:7)
Y0228-26	YPYYTGRSHWYFD (SEQ ID NO:72)

Y0228-27	YPYYTNTSHWYFD (SEQ ID NO:73)
Y0228-28	YPYYRKGSHWYFD (SEQ ID NO:74)
Y0228-29	YPYYTGSSHWHYFD (SEQ ID NO:75)
Y0228-30	YPYYRSGSHWYFD (SEQ ID NO:76)
Y0229-20	YPYYTNRSHWYFD (SEQ ID NO:77)
Y0229-21	YPYYRNSSHWYFD (SEQ ID NO:78)
Y0229-22	YPYYKESSHWYFD (SEQ ID NO:79)
Y0229-23	YPYYRDASHWYFD (SEQ ID NO:80)
Y0229-24	YPYYRQKGHWYFD (SEQ ID NO:81)
Y0229-25	YPYYKGGSHWYFD (SEQ ID NO:82)
Y0229-26	YPYYYGASHWYFD (SEQ ID NO:83)
Y0229-27	YPYYRGESHWYFD (SEQ ID NO:84)
Y0229-28	YPYYRSTSHWYFD (SEQ ID NO:85)
Variantes de biblioteca HL-265	
Nome	Sequência VH1 (resíduo 26 a 35)
Y0243-1	GYDFTHYGMN (5/10 clones) (SEQ ID NO:86)
Y0243-2	GYEFQHYGMN (SEQ ID NO:87)
Y0243-3	GYEFTHYGMN (SEQ ID NO:88)
Y0243-4	GYDFGHYGMN (SEQ ID NO:89)
Y0243-5	GYDFSHYGMN (SEQ ID NO:90)
Y0243-6	GYEFSHYGMN (SEQ ID NO:91)
Variantes de biblioteca YC-101	
Nome	Sequência “CDR7” VH (resíduos 70 a 79).
Y0228-27	YPYYTNTSHWYFD (SEQ ID NO:73)
Y0244-1	FSVDVSKSTA (SEQ ID NO:92)
Y0244-2	FSLDKSKSTA (SEQ ID NO:93)

Y0244-3	FSLDVWKSTA (SEQ ID NO:94)
Y0244-4	FSIDKSKSTA (:95)

[00230] A Sequência da região randomizada apenas é mostrada quando de-duzida de seqüenciamento de DNA.

[00231] Quando uma quantidade de clones foram testados junto com o pY0192 do clone parental em teste ELISA de fago, nenhum exibiu um desenvolvimento distinto do clone original. Isto poderia ser explanado pela escala de tempo na qual o teste foi realizado (< 3 horas).

[00232] A fim de quantificar o desenvolvimento em ligação de antígeno em clone parental, diversos DNA de variantes anti-VEGF foram transformados em *E. coli* cepa 34B8, expresso como Fab, e purificados passando-se o chocado peri-plasmico por meio de uma coluna de proteína G (Pharmacia) como descrito no Exemplo 2 acima.

[00233] *Variantes de Combinação CDR:* Para melhorar a afinidade de ligação de VEGF ainda, as mutações encontradas pela exibição de fago foram combinadas em diferentes CDRs para criar múltiplos mutantes CDR. Em particular, as mutações identificadas nas variantes de fago melhoradas de mais afinidade de bibliotecas VH1, VH2, e VH3 foram combinadas (Tabela 14) a fim de testar quanto à aditividade de suas contribuições para a afinidade de ligação.

TABELA 14: Combinação de Variantes Anti-VEGF CDR.

Nome	Clone parental	Oligo de mutagênese / comentários	Sequência
Y0313-1	Y0243-1	YC-115 (VH3 H101Y e S105T)	5'-GCAAAGTACCCGTACTATTATGGGACGAG-CCACTGGTATTC-3' (SEQ ID NO:96)
Y0317	Y0313-1	YC-108 (reverte VL1 de volta ao tipo silvestre)	5'-GTCACCATCACCTGCAGCGCAAGTCAGGA-TATTAGCAACTATTTAAC-3' (SEQ ID NO:97)

Y0313-3	Y0238-3	YC-116 (VH3; T105S)	5'-CCGTACTATTATGGGAGCAGCCACTGG-TATTTC-3' (SEQ ID NO:98)
---------	---------	---------------------	---

[00234] As mutações dos vetores originais indicados foram combinadas com aquelas do oligonucleotídeo indicado pela mutagênese direcionada ao sítio para produzir as variantes de combinação listadas.

[00235] A versão Y0317 é equivalente a Y0313-1 exceto que a mutação de fundamento em VL1 foi removida e sua Sequência revertida para aquela em pY0101. Os efeitos de mutação H101Y e S105T foram testados construindo-se um mutante de reversão de Y0238-3.

[00236] *Análise BIACore:* As afinidades de ligação de VEGF de fragmentos Fab foram calculadas de constantes taxas de associação e dissociação medidas empregando-se um sistema de ressonância de plasmônio de superfície BIACore 2000™ (BIACore, Inc., Piscataway, NJ). Um *chip* biosensor foi ativado para união covalente de VEGF empregando-se cloridrato de N-etil-N’-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções dos fornecedores (BIACore, Inc., Piscataway, NJ). O VEGF foi trocado tamponado em 20 mM de acetato de sódio, pH 4,8 e diluído para aproximadamente 50 µg/mL. Uma alíquota (35 µL) foi injetada em uma taxa de fluxo de 2 µL/min para obter aproximadamente 700 a 1400 unidades de resposta (RU) de proteína unida. Finalmente, 1M de etanolamina foi injetado como um agente de bloqueio.

[00237] Para as medições cinéticas, diluições duas vezes consecutivas de Fab foram injetadas em tampão PBS/TWEEN™ (0,05% TWEEN 20™ em solução salina tamponada de fosfato) a 25°C em uma taxa de fluxo de 10 µL/min. Em taxas e extra-taxas foram calculadas empregando-se protocolos padrão (Karlsson e outros. *J. Immun. Methods* 145: 229 - 240 (1991)). As constantes de dissociação de

equilíbrio, Kd's de medições de ressonância de plasmônio de superfície (SPR) foram calculadas como koff/kon. Os dados são mostrados na Tabela 15 abaixo.

TABELA 15: Cinéticos de ligação de Fab-VEGF de medições BIACore™				
Variante	Kon ( $10^4$ /M/s)	Koff( $10^{-4}$ /s)	Kd ( <u>nM</u> )	Kd (peso)/Kd (mut)
Y0244-1	3,4	2,7	8	3,6
Y0244-4	5,2	1,7	3,3	0,9
Y0243-1	6,7	0,45	0,7	4,1
Y0238-3	1,7	$\leq 0,04^*$	$\leq 0,2^*$	$\geq 14^*$
Y0238-7	1,5	$\leq 0,06^*$	$\leq 0,4^*$	$\geq 7,3^*$
Y0238-10	1,6	0,09	0,6	4,8
Y0238-5	0,8	0,08	0,9	3,2
Y0238-1	2,6	0,09	0,4	7,3
Y0313-1	3,5	$\leq 0,054^*$	$\leq 0,15^*$	$\geq 20^*$
Y0313-3	1,2	0,081	0,65	4,5

A taxa de dissociação observada provavelmente reflete um limite superior para a taxa de dissociação real nestas experiências, uma vez que a extra-taxa é aproximação do limite de detecção pelo BIACore.

[00238] Os dados do BIACore™ na Tabela 15 mostram que diversas variantes melhoraram a afinidade sobre o Y0192. Por exemplo, uma variante CDRH1, Y0243-1, mostrou afinidade 4,1 vezes realçada, aumentando das mutações T28D e N31H. A variante Y0238-3 exibiu pelo menos um aumento de 14 vezes em afinidade de ligação sobre Y0192. Ambas as mutações CDRH3 contribuem para a afinidade melhorada de Y0238-3 porque a reversão de T105 para S (variante Y0313-3) reduz a afinidade de Y0238-3 de 0,15 nM para 0,65 nM (veja a Tabela 15). O maior realce de afinidade relativa a Y0192 foi visto para Y0313-1, que contém as mutações CDRH3 combinadas com as mutações CDRH1.

[00239] *Teste Com Base em Célula de Inibição de VEGF:* Diversas versões do anticorpo anti-VEGF A4.6.1 foram testadas quanto a suas capacidades para antagonizar o VEGF (recombinante; versão 1-165) em indução do crescimento de HuVECs (células endoteliais de veia umbilical humana). As placas de poço 96 foram semeadas com 1000 HuVECs por poço e fixadas em um meio de teste (F12: DMEM 50:50 suplementado com 1,5% de soro bovino fetal diafiltrado) durante 24 horas. A concentração de VEGF empregada para indução das células foi determinada primeiro por titulação para a quantidade de VEGF que pode estimular 80% de síntese de DNA máxima. O meio de teste fresco contendo as quantidades fixadas de VEGF (0,2 nM de concentração final), e aumentando as concentrações de anti-VEGF Fab ou Mab foi então adicionado. Após 40 horas de incubação, a síntese de DNA foi medida por incorporação de timidina titulada. As células foram pulsadas com 0,5 µCi por poço de [3H]-timidina durante 24 horas e colhidas para contagem, empregando-se um contador gama TopCount.

[00240] Os resultados (Figura 11) mostram que a forma IgG de comprimento natural de F(ab)-12 foi显著mente mais potente em inibição de atividade VEGF do que a forma Fab (aqui, Y0192 foi empregada). Entretanto, ambas as variantes Y0238-3 e Y0313-1 exibiram mesmo mais potente inibição de atividade VEGF do que ou o Y0192 Fab ou F(ab)-12 Mab. Comparando as formas Fab, a variante Y0313-1 mostrou-se > 30 vezes mais potente do que o Fab tipo silvestre. Observou-se que a quantidade de VEGF (0,2 nM) usada neste teste é potencialmente limitante para a determinação de um IC50 preciso para o mutante. Por exemplo, se a afinidade de ligação (Kd) do mutante é de fato < 0,2 nM, o IC50 nesta experiência mostrar-se-á maior do que sob condições de concentração VEGF inferior. O resultado portanto suporta a conclusão de que a variante de melhorada afinidade é pelo menos 30 vezes melhorada em afinidade para VEGF,

e que ela eficazmente bloqueia a atividade de VEGF *in vitro*. Uma vez que a variante Y0317 difere de Y0313-1 apenas na reversão da Sequência VL1 para o tipo silvestre (Figura 10A), é previsto que Y0317 terá similar atividade para Y0313-1.

[00241] A variante Y0317 (Fab) e variante humanizada F(ab)-12 do Exemplo 1 (comprimento natural e Fab) foram comparadas quanto a suas capacidades de inibir a proliferação de célula endotelial capilar bovina em resposta a uma concentração aproximadamente maximamente eficaz de VEGF empregando-se o teste descrito no Exemplo 1. Conforme ilustrado na Figura 12, a Y0317 foi marcadamente mais eficaz em inibição de proliferação de célula endotelial capilar bovina do que as formas de comprimento natural e Fab de F(ab)-12 neste teste. A Y0317 de afinidade amadurecida Fab demonstrou um valor ED<sub>50</sub> neste teste que foi pelo menos cerca de 20 vezes menor do que o F(ab)-12 Fab.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humanizado anti-fator de crescimento endotelial vascular humano, **caracterizado** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 7 e a sequência de aminoácidos do domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8.

2. Anticorpo humanizado anti-fator de crescimento endotelial vascular humano, **caracterizado** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 116 e a sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 115.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de ser um anticorpo completo.

4. Anticorpo de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de ser uma IgG humana.

5. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de ser um Fab.

6. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

1 10 20 30 40  
A4.6.1 BIQLVQSGPELKQPGETVRISCKASGYTPTNYGMNWVRQA  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

F(ab)-12 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTPTNYGMNWVRQA  
\* \* \* \* \*

humIII EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTPTFSSYAMSWVRQA

50 a 60 70 80  
A4.6.1 PGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADPKRRFTFSLETSASTAYL  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

F(ab)-12 PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADPKRRFTFSLDTSKSTAYL  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

humIII PGKGLEWVSVISGDGGSTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL

abc 90 110  
A4.6.1 QISNLKNDDTATYFCAKYPHYYGSSHWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ.ID NO:9)  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

F(ab)-12 QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQCTLVTVSS (SEQ.ID NO:7)

humIII QMNSLRAEDTAVYYCARG-----FDYWGQCTLVTVSS (SEQ.ID NO:11)

## FIG.\_ 1A

1 10 20 30 40  
A4.6.1 DIQMTQTSSLSASLGDRVIISCASQDISNYLNWYQQKP  
\* \* \* \* \* \* \* \* \*

F(ab)-12 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP  
\* \* \* \* \*

humKI DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNYLAWYQQKP

50 60 70 80  
A4.6.1 DGTVKVLIYPTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEP  
\* \* \* \* \* \* \* \* \*

F(ab)-12 GKAPKVLIYPTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP  
\* \* \* \*

humKI GKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP

90 100  
A4.6.1 EDIATYYCQQYSTVPWTFGGGTKLEIKR (SEQ.ID NO:10)  
\* \* \* \* \*

F(ab)-12 EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ.ID NO:8)  
\*\*\*

humKI EDPATYYCQQYNSLPWTFGQGTKVEIKR (SEQ.ID NO:12)

## FIG.\_ 1B

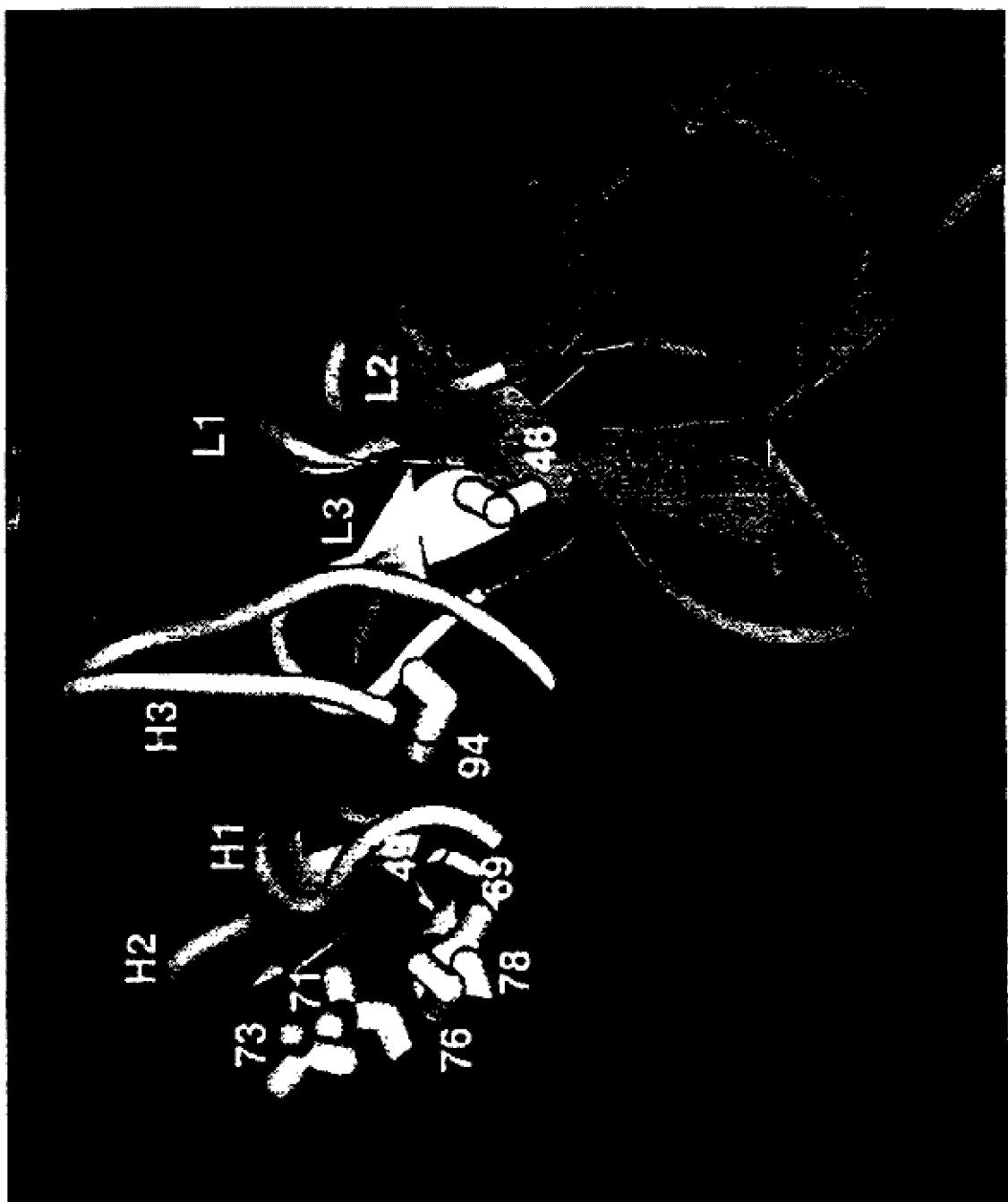
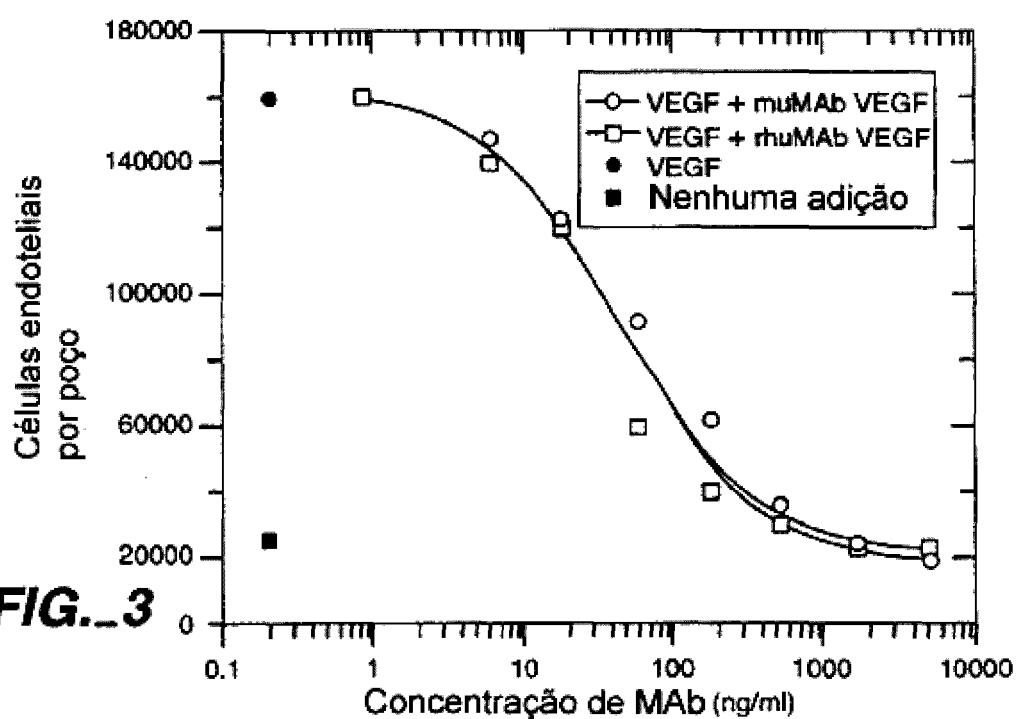
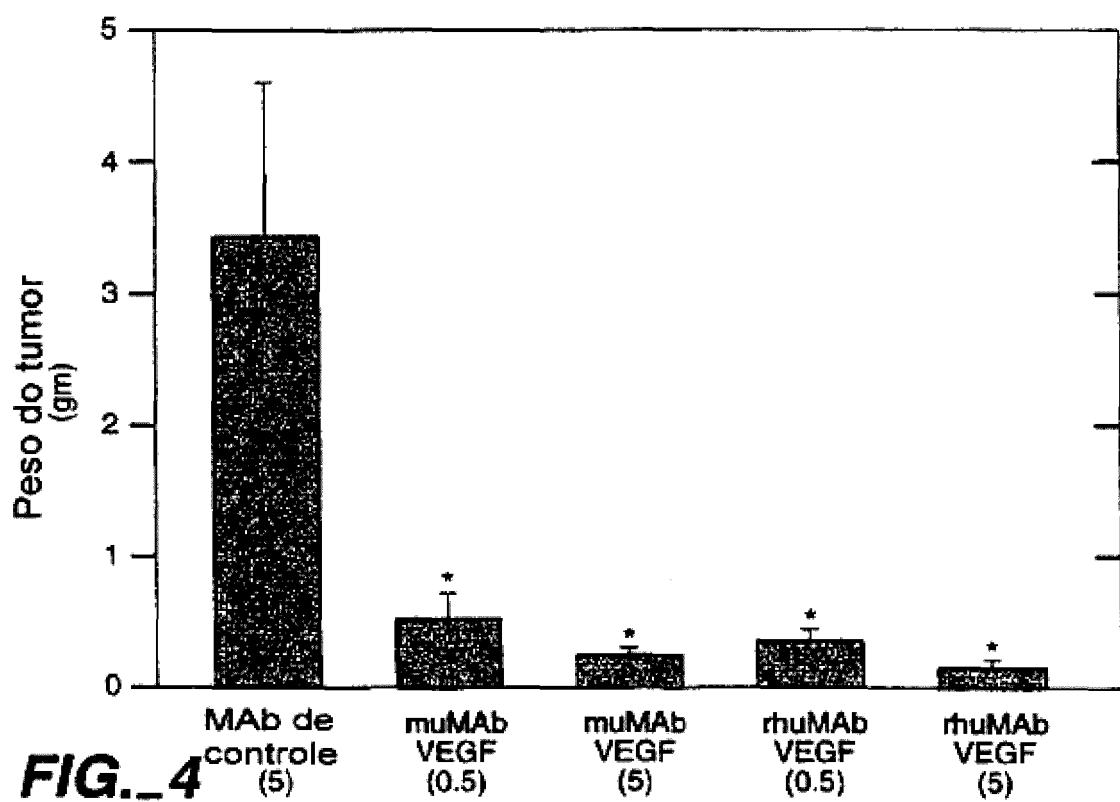


FIG. 2

**FIG.\_3****FIG.\_4**

10            20            30            40  
A4.6.1 DIQMTQTTSSLASLGDRVIIISCSASQDISNYLNWYQQKP  
      \*\*\*      \*      \*\*\*

hu2.0 DIQMTQSPSSLASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKP

hu2.10 DIQMTQSPSSLASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKP

50            60            70            80  
A4.6.1 DGTVKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEP  
      \*\*\*\*\*    \*      \*\*\*      \*

hu2.0 GKAPKLLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP

hu2.10 GKAPKLLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQP

90            100  
A4.6.1 EDIATYYCQQYSTVPWTFFGGTKLEIK      (SEQ.ID NO:10)  
      \*          \*      \*      \*

hu2.0 EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK      (SEQ.ID NO:13)

hu2.10 EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK      (SEQ.ID NO:15)

## **FIG.\_5A**

10            20            30            40  
A4.6.1 EIQLVQSGPELKQPGETVRISCKASGYTFTNYGMNWVKQA  
      \*      \*      \*\*\*      \*      \*      \*

hu2.0 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA

hu2.10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWIRQA

50 a            60            70            80  
A4.6.1 PGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFKRRFTSLETSASTAYL  
      \*      \*

hu2.0 PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTISRDNSKNTLYL

hu2.10 PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTISLDTASTVYL

abc            90            100abcdef            110  
A4.6.1 QISNLKDDEDTATYFCAKYPHYGGSSHWHYFDVWGAGTTVTVSS      (SEQ.ID NO:9)  
      \*\*\*\*      \*      \*      \*

hu2.0 QMNSLRAEDTAVYYCARYPHYYGSSHWHYFDVWGQGTLTVSS      (SEQ.ID NO:14)

hu2.10 QMNSLRAEDTAVYYCARYPHYYGSSHWHYFDVWGQGTLTVSS      (SEQ.ID NO:16)

## **FIG.\_5B**

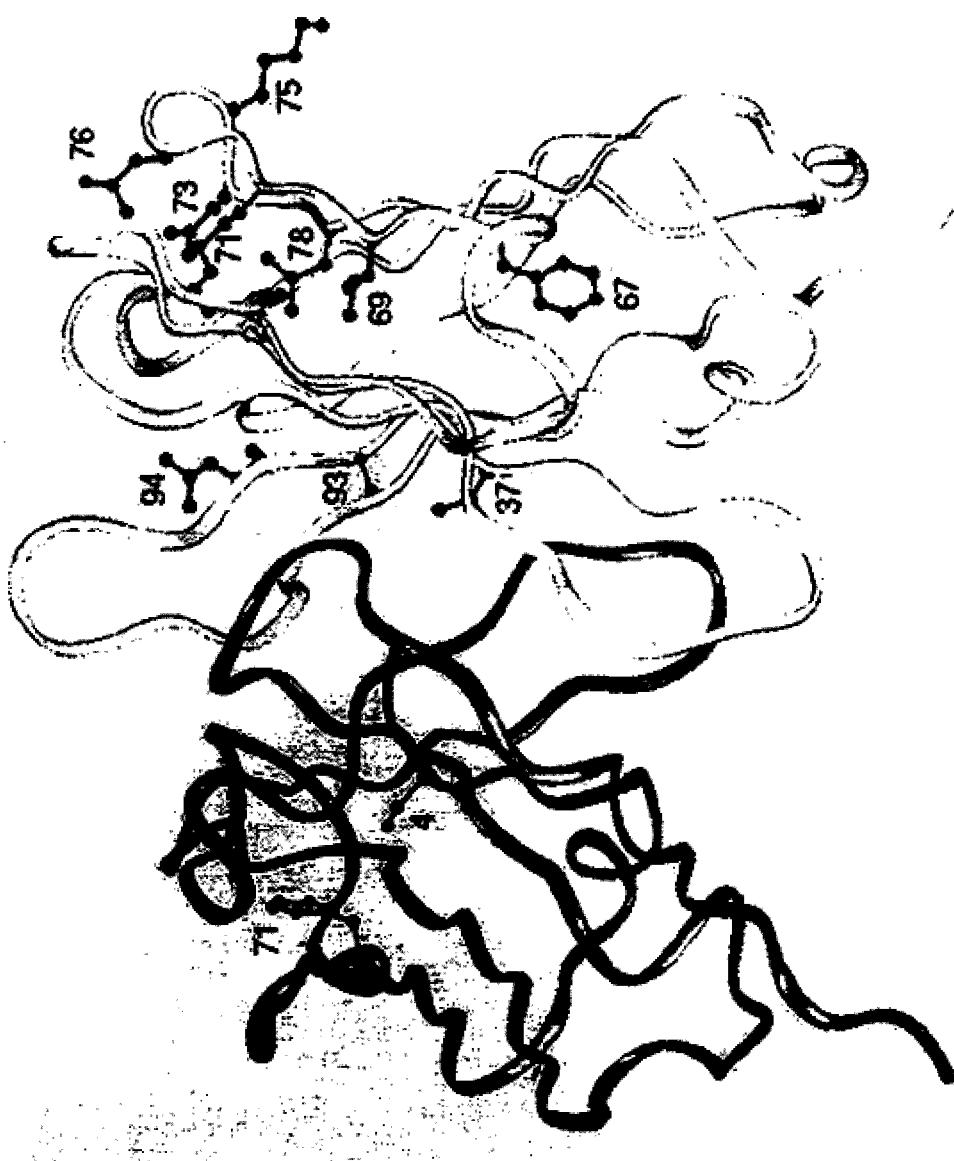
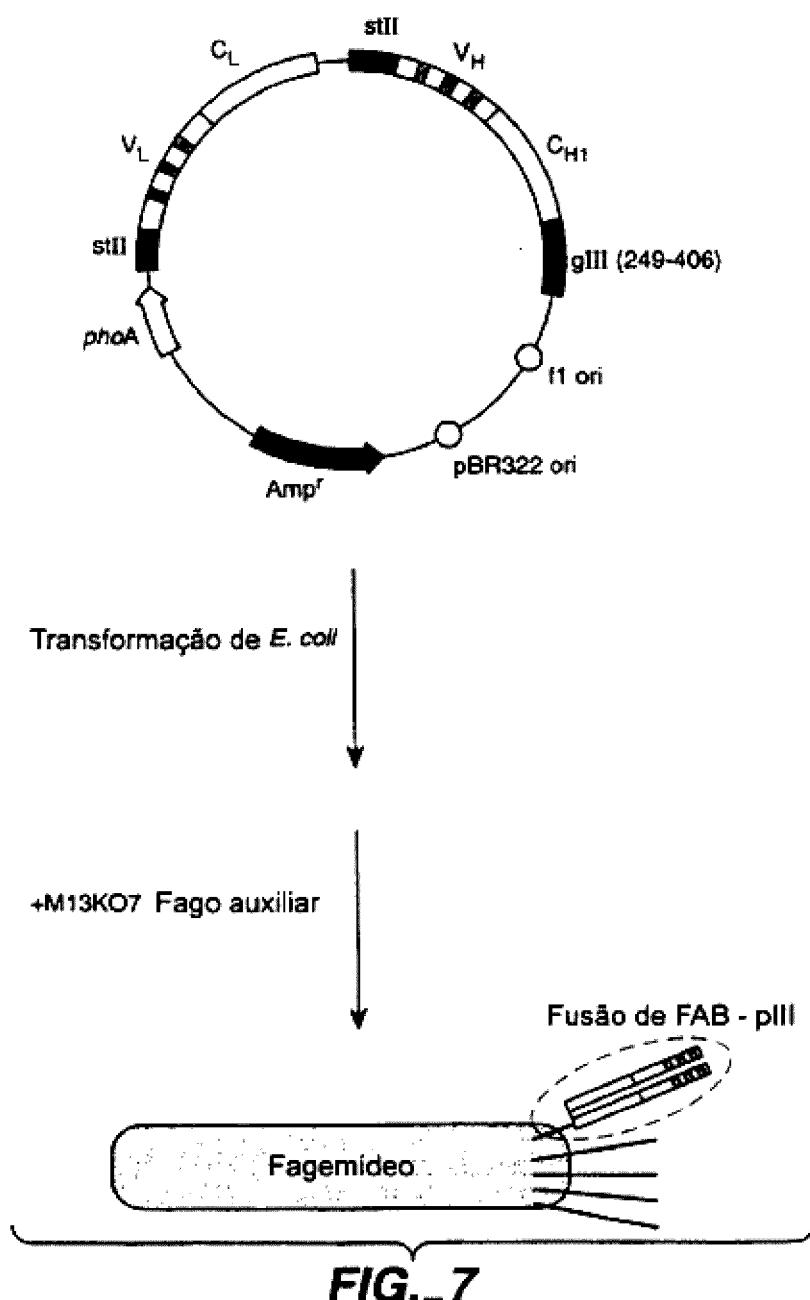


FIG. 6



GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AATACAGAC ATGAAAAATC TCATTGCTGA	60
GTTGTTATTT AAGCTTTGGA GATTATCGTC ACTGCAATGC TTGCAATAT GCGGAAAT	120
GACCAACAGC GGTGATTGAG TCAGGTAGAG GGGCGCTGT ACGAGGTAAA GCGGATGCC	180
AGCATTCTG ACACGATAC GGAGCTGCTG CGCGATTAGG TAAAGAAGTT ATTGAAGCAT	240
CCTCGTCAGT AAAAGTTAA TCTTTCAAC AGCTGTACATA AAGTTGTCAC GCGGAGACT	300
TATAGTCGCT TTGTTTTAT TTTTAATGT ATTTGTAACT AGAATTCCAG CTCGGTACCC	360
GGGGATCCTC TAGAGGTTGA GGTGATTIT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu -23 -20	413
CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAT Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp -15 -10 -5 1	461
BEGIN SIGNAL SEQUENCE	
ATC CAG TTG ACC CAG CCG AGC TCC CTG TCC GCC TCT GTG GGC GAT Ile Gln Leu Thr Gin Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp 5 10 15	509
AGG GTC ACC ATC ACC TGC AGC GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAC TAT TTA Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu 20 25 30	557
BEGIN LIGHT CHAIN	
AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCG AAA CTA CTG ATT TAC Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr 35 40 45	605
TTC ACC TCC TCT CTC CAC TCT GGA GTC CCT TCT CGC TTC TCT GGA TCC Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser 50 55 60 65	653
GGT TCT GGG ACG GAT TAC ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAG CCA GAA Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gin Pro Glu 70 75 80	701
GAC TTC GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TAT AGC ACC GTG CCG TGG ACG Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr 85 90 95	749
TTT GGA CAG GGT ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro 100 105 110	797
TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr 115 120 125	845
GCT TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys 130 135 140 145	893

**FIG.\_8A**

GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu 150 155 160	941
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser 165 170 175	989
ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala 180 185 190	1037
TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe 195 200 205	1085
AAC AGG CGA GAG TGT T AAGCTGATCC TCTACGCCGG ACCCATCGTG Asn Arg Gly Glu Cys O C*	1131
210	
GGCCCTAGTAC GCAACTACTC GTAAAAAGGG TATCTAGACC TTGAGCTGAT TTT ATG Met -23	1187
BEGIN stII SIGNAL SEQUENCE AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile -20 -15 -10	1235
GCT ACA AAC GCG TAC GCT GAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT GGC GGT GGC Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly -5 1 5 10	1283
CTG GTG CAG CCA GGG GGC TCA CTC CGT TTG TCC TGT GCA GCT TCT GGC Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly 15 20 25	1331
BEGIN HEAVY CHAIN TAT ACC TTC ACC AAC TAT GGT ATG AAC TGG ATC CGT CAG GCC CCG GGT Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly 30 35 40	1379
RAG GGC CTG GAA TGG GTT GGA TGG ATT AAC ACC TAT ACC GGT GAA CCG Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro 45 50 55	1427
ACC TAT GCT GCG GAT TTC AAA CGT CGT TTT ACT ATA TCT GCA GAC ACC Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr 60 65 70	1475
TCC AGC AAC ACA GTT TAC CTG CAG ATG AAC AGC CTG CGC CCT GAG GAC Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 75 80 85 90	1523
ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCA AAG TAC CCG CAC TAT TAT GGG AGC AGC Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser 95 100 105	1571

**FIG.\_8B**

CAC TGG TAT TTC GAC GTC TGG GGT CAA GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 110 115 120	1619
TCG GCC TCC ACC AAC GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 125 130 135	1667
AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 140 145 150	1715
TAC TTC CCC GAA CGG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 155 160 165 170	1763
AGC GGC GTG CAC ACC TTC CGG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 175 180 185	1811
TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 190 195 200	1859
ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 205 210 215	1907
AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC CTC TAG AGT GGC Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu * Ser Gly 220 225 230	1955
GGT GGC TCT GGT TCC GGT GAT TTT GAT TAT GAA AAG ATG GCA AAC GCT Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala 235 240 245 250	2003
END LIGHT CHAIN BE AAT AAG GGG GCT ATG ACC GAA AAT GGC GAT GAA AAC GCG CTA CAG TCT Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser 255 260 265	2051
GIN g3p DOMAIN GAC GCT AAA GGC AAA CTT GAT TCT GTC GCT ACT GAT TAC GGT GCT GCT Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala 270 275 280	2099
ATC GAT GGT TTC ATT GGT GAC GTT TCC GGC CTT GCT AAT GGT AAT GGT Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly 285 290 295	2147
GCT ACT GGT GAT TTT GCT GGC TCT AAT TCC CAA ATG GCT CAA GTC GGT Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly 300 305 310	2195
GAC GGT GAT AAT TCA CCT TTA ATG AAT AAT TTC CGT CAA TAT TTA CCT Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro 315 320 325 330	2243

**FIG.\_8C**

TCC CTC CCT CAA TCG GTT GAA TGT CGC CCT TTT GTC TTT AGC GCT GGT Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Ser Ala Gly 335 340 345	2291
AAA CCA TAT GAA TTT TCT ATT GAT TGT GAC AAA ATA AAC TTA TTC CGT Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg 350 355 360	2339
GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA TTT Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe 365 370 375	2387
TCT ACG TTT GCT AAC ATA CTG CGT AAT AAG GAG TCT TAATCATGCC Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser OC* (SEQ.ID NO:100) 380 385 390	2433
AGTTCCTTTG GCTAGGGCGG CCTCTATACCT TGTCTGCCTC CCCGCGTTGC GTGGGGTGC Fim da proteína G3	2493
ATGGAGCCGG GCCACCTCGA CCTGAATGGA ACCCGGGCGGC ACCTCGCTAA CGGATTCAAC	2553
ACTCCAAGAA TTGGAGCCAA TCAATTCTTG CGGAGAACTG TGAATGCCAA AACCAACCT	2613
TGGCAGAACAA TATOCATCGC GTCCGCCATC TCCAGCAGCC GCAOGCGGGG CATCTGGGC	2673
AGCGTTGGGT CCTGGGCCAGG GGTGGCCATG ATCGTGTCTC TGTCGTTGAG GACCEGGCTA	2733
GGCTGGGGGG GTTGCTTAC TGGTTAGCAG AATGAATCAC CGATAACGGGA CGGAACGTGA	2793
AGCGACTGCT GCTGCAAACAC GTCTGCGACC TGAGCAACAA CATGAATGGT CTTGGTTTC	2853
CGTGTGGTAAAGCTGGA AACCGGGAAAG TCAGCGCCCT GCACCATTTAT GTTCCGGATC	2913
TGCATCGCAG GATGCTCTG GCTACCCCTGT GGAACACCTA CATCTGTATT AACGAAGCOC	2973
TGGCATTTGAC CCTGAGTGAT TTTCTCTGG TCCCGCCGCA TCCATACCGC CAGTTGTTTA	3033
CCCTCACACG GTTCCAGTAA CGGGCATGT TCATCATCAG TAACCGTAT CGTGAGCCTC	3093
CTCTCTCGTT TCATCGGTAT CATTACCCCC ATGAAACAGAA ATTCCCCCTT ACACGGAGGC	3153
ATCAAGTGAC CAAACAGGAA AAAACGGCCC TTAACATGGC CGCGTTTATC AGAAGCCAGA	3213
CATTAACGCT TCTGGAGAAA CTCACCGAGC TGGACGGGA TGAACAGGCA GACATCTGTG	3273
AATCGCTTCA CGACCAACGCT GATGAGCTTT ACCGGAGGAT CGGGAAATTG TAAACGTTAA	3333
TATTTTGTAA AAATTCGGT TAAATTTTG TTAATCAGC TCATTTTTTA ACCAATAGGC	3393
CGAAAATGGC AAAATCCCTT ATAATCAAAGA AGAATAGACC GAGATAGGGT TGAGTGTGTT	3453
TCCAGTTGGG AACAAAGACTC CACTATTAAA GAACGTOGAC TCCAAACGTCA AAGGGCGAAA	3513
AACCGTCTAT CAGGGCTATG GCCCACCTACG TGAACCATCA CCCTAATCAA GTTTTTGGG	3573
GTCGAGGTGC CGTAAGGCAC TAAATCGGAA CCCTAAAGGG AGCCCCCGAT TTAGAGCTTC	3633

**FIG.\_8D**

ACGGGGAAAG CGGGCGAACG TGGCAGAAA GGAAGGGAAAC AAAGCGAANG GAGCGGGCGC 3693  
 TAGGGCGCTG GCAAGTGTAG CGGTCAACGCT GCAGCGTAACC ACCACACCCG CCGCGCTTAA 3753  
 TGGCGCCGCTA CAGGGCGCGT CGCGATCGTG CCTCGCGCGT TTGGGTGATG ACGGTAAAAA 3813  
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGGGG ATGCCGGGAG 3873  
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC 3933  
 CCAGTCAGT AGCGATAGCG GAGTGTATACT TGGCTTAACCT ATGCCGCATC AGAGCAGATT 3993  
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC 4053  
 CGCATCAGGC GCTCTTCGCG TTCTCGCTC ACTGACTCCG TGCGCTCGGT CGTTGGCTG 4113  
 CGGCAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGAT 4173  
 AACCCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CGAGGAACCG TAAAAAGGCC 4233  
 CGGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCGC CCCCTGAGG AGCATCACAA AAAATCGACGC 4293  
 TCAAGTCAGA CGTGGCGAAA CGCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCCTT TCCCCCTGGA 4353  
 AGCTCCCTCG TGGCTCTCC TGTTCGACCC CTGCGCTTAA CGCGATACTT GTCCGCCTTT 4413  
 CTCCCCCTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCATAGT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTGGTG 4473  
 TAGGTGTTTC GCTCCAGCT GGGCTGTGIG CACGAACCCC CGTTCAAGCC CGACCGCTGC 4533  
 GCCTTATCCG GAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATGCCCACTG 4593  
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC 4653  
 TTGAAGTGGT GGCTTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGGCTCTG 4713  
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GCTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC 4773  
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCAGAAG CAGCAGATTA CGCCGAGAAA AAAAGGATCT 4833  
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAACTCACGT 4893  
 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTCA CCTAGATCTT TTTAAATTAA 4953  
 AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGCTCTGA CAGTTACCAA 5013  
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTGTTTCATC CATAGTTGCC 5073  
 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT 5133  
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCGCCA 5193  
 GCCGGAAAGGG CGGAGGGCG AAGTGGTCTT GCAACTTAT CGCGCTCCAT CGAGTCTATT 5253

**FIG.\_8E**

AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT	TGCCAGTTA	ATAGTTTGC	CAACGTTGTT	5313
GCCATTGCTG	CAGGCATCGT	GGTGTACGC	TGGTCGTTTG	GTATGGCTTC	ATTCAGCTCC	5373
GGTTCCCAAC	GATCAAGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT	TGTGCAAAA	AGCGGTTAGC	5433
TCCCTCGGTC	CTCCGATCGT	TGTCAGAAGT	AAAGTTGGCG	CAGTGTATTC	ACTCATGGTT	5493
ATGGCAGCAC	TGGATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT	TTCTGTGACT	5553
GGTGAGTACT	CAACCAAGTC	ATTCTGAGAA	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG	TTGCTCTTGC	5613
CCGGCGTCAA	CACGGGATAA	TACCGOGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT	5673
GGAAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAACACTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCG	5733
ATGTAACCCA	CTCGTGCACC	CAACTGATCT	TCAGGCATCTT	TTACTTTTAC	CAGCGTTTCT	5793
GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCACAAAAGG	GAATAAGGGC	GACACGGAAA	5853
TGTTGAATAAC	TCATACTCTT	CTTTTTCAA	TATTATTGAA	GCATTTATCA	GGGTTATTGT	5913
CTCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGTATT	TAGAAAAATA	AAACAAATAGG	GGTTCCGGCC	5973
ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC	TAAGAAACCA	TTATTATCAT	GACATTAACC	6033
TATAAAAATA	GGCGTATCAC	GAGGCCCTTT	CGTCTTCAA			6072

**FIG.\_8F**

	10	20	30	40
F(ab)-12	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
MB1.6	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
H2305.6	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
Y0101	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
Y0192	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC <span style="text-decoration: underline;">RANEODS</span>	NYLNWYQQKP
			CDR-L1	
	50	60	70	80
F(ab)-12	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
MB1.6	<u>GKAPKVLIYF</u>	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	<u>FTLTISLQP</u>
H2305.6	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	<u>FTLTISLQP</u>
Y0101	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
Y0192	<u>GKAPKVLIYF</u>	<u>TSSLHSGVPS</u>	RFSGSGSGTD	FTLTISLQP
			CDR-L2	
	90	100	110	
F(ab)-12	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:8)
MB1.6	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:101)
H2305.6	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:103)
Y0101	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:105)
Y0192	<u>EDFATYYCQQ</u>	<u>YSTVPWTFGQ</u>	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:107)
			CDR-L3	

## FIG.\_9A

	10	20	30	40	
F(ab)-12	EVQLVESGGG	LVOPPGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA	
MB1.6	EVQLVESGGG	LVOPPGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA	
H2305.6	EVQLVESGGG	LVOPPGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA	
Y0101	EVQLVESGGG	LVOPPGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA	
Y0192	EVQLVESGGG	LVOPPGSLRL	SCAASGYTFT	<u>NYGMNWVRQA</u>	
			CDR-H1		
	50	60	70	80	
F(ab)-12	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFRRRTF	SLDTSKSTAY	
MB1.6	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFRRRTF	<u>SADTSSNIVY</u>	
H2305.6	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFRRRTF	<u>SADTSSNIVY</u>	
Y0101	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFRRRTF	SLDTSKSTAY	
Y0192	<u>PGKGLEWVGW</u>	<u>INTYTGEPTY</u>	<u>AADFRRRTF</u>	<u>SLDTSKSTAY</u>	
			CDR-H2	CDR-7	
	90	100	110		
F(ab)-12	LQMNSLRRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:7)
MB1.6	LQMNSLRRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:102)
H2305.6	LQMNSLRRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:104)
Y0101	LQMNSLRRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:106)
Y0192	LQMNSLRRAED	<u>TAVYYCAKYP</u>	<u>HYYGSSHWF</u>	<u>DVWGQGTL</u>	(SEQ.ID NO:108)
			CDR-H3		

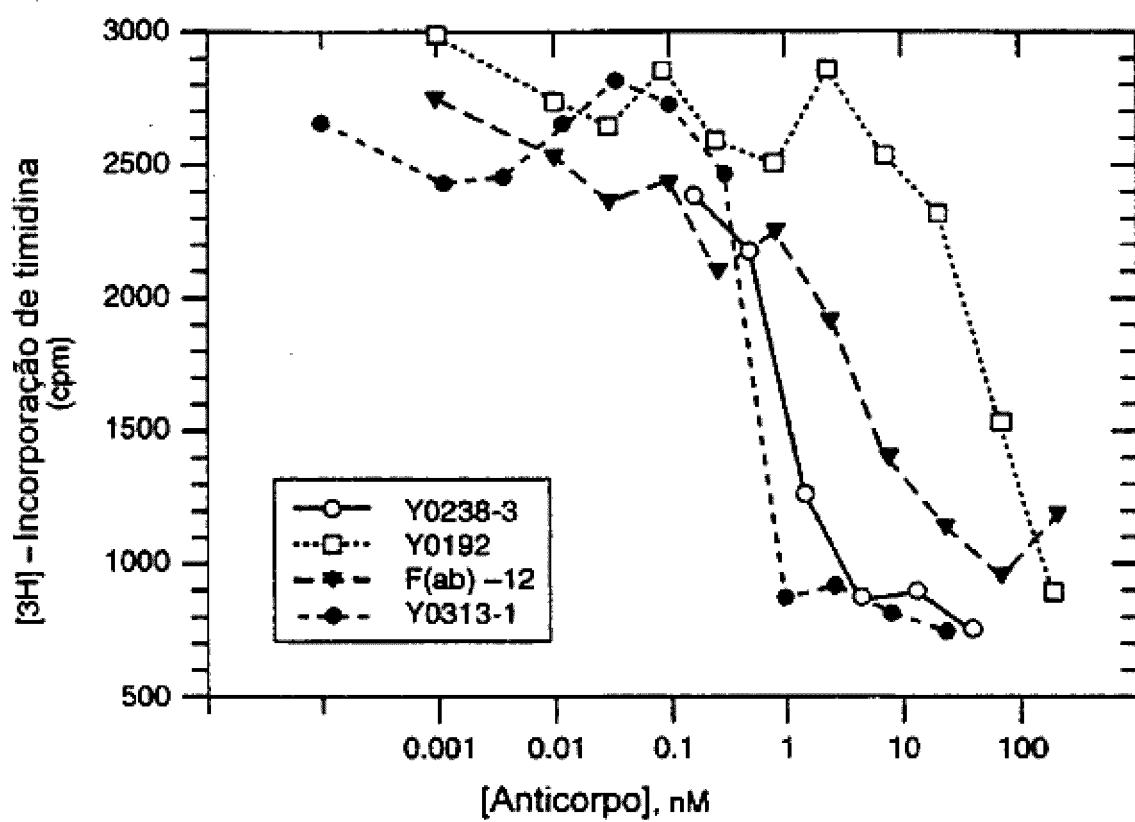
## FIG.\_9B

	10	20	30	40
F(ab)-12	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQKP
Y0243-1	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0238-3	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0313-1	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRANEQLS	NYLNWYQQKP
Y0317	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	<u>ITCSASQDIS</u>	NYLNWYQQKP
	CDR-L1			
	50	60	70	80
F(ab)-12	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP
Y0243-1	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP
Y0238-3	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP
Y0313-1	GKAPKVLIYF	TSSLHSGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP
Y0317	GKAPKVLIYF	<u>TSSLHSGVPS</u>	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP
	CDR-L2			
	90	100	110	
F(ab)-12	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:8)
Y0243-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:109)
Y0238-3	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:111)
Y0313-1	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:113)
Y0317	EDFATYYCQQ	<u>YSTVPWTFGQ</u>	GTKVEIKRTV	(SEQ.ID NO:115)
	CDR-L3			

## FIG.\_ 10A

	10	20	30	40	
F(ab)-12	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWVRQA	
Y0243-1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	<u>HYGMNWVRQA</u>	
Y0238-3	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGDNWVRQA	
Y0313-1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYDFT	<u>HYGMNWVRQA</u>	
Y0317	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	<u>SCAASGYDFT</u>	<u>HYGMNWVRQA</u>	
	CDR-H1				
	50	60	70	80	
F(ab)-12	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKKRRTF	SLDTSKSTAY	
Y0243-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKKRRTF	SLDTSKSTAY	
Y0238-3	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKKRRTF	SLDTSKSTAY	
Y0313-1	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY	AADFKKRRTF	SLDTSKSTAY	
Y0317	PGKGLEWVGW	<u>INTYTGEPTY</u>	<u>AADFKKRRTF</u>	<u>SLDTSKSTAY</u>	
	CDR-H2				
	90	100	110		
F(ab)-12	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:7)
Y0243-1	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWF	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:110)
Y0238-3	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	<u>HYYGISHWF</u>	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:112)
Y0313-1	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	<u>HYYGISHWF</u>	DVWGQGTL	(SEQ.ID NO:114)
Y0317	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	<u>HYYGISHWF</u>	<u>DVWGQGTL</u>	(SEQ.ID NO:116)
	CDR-H3				

## FIG.\_ 10B



**FIG.\_ 11**

