



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

(11) BR 112012010153-6 B1



(22) Data do Depósito: 05/11/2010

(45) Data de Concessão: 03/05/2022

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO

(51) Int.Cl.: C07K 16/00; C12N 15/70; C12N 15/67.

(30) Prioridade Unionista: 05/11/2009 US 61/258,565.

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

(72) Inventor(es): MATTHEW MARRICHI; DOROTHEA E. REILLY.

(86) Pedido PCT: PCT US2010055702 de 05/11/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/057120 de 12/05/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2012

(57) Resumo: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO, POLINUCLEOTÍDEO, ANTICORPO E COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA A presente invenção refere-se de modo geral ao campo da biologia molecular e tecnologia de proteínas. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada a sequência-sinal para a secreção de polipeptídeos heterólogos a partir de bactérias. A invenção também diz respeito à polipeptídeos recombinantes e seus respectivos usos.

“MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO”

REFERÊNCIA CRUZADA PARA OS PEDIDOS RELACIONADOS

[1] O presente pedido reivindica a prioridade ao pedido de Patente Norte Americano número US 61/258.565, depositado em 05 de novembro de 2009, cujo conteúdo é incorporado ao presente pela referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[2] A presente invenção refere-se de modo geral ao campo da biologia molecular e tecnologia de proteínas. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada a sequências sinal para a secreção de polipeptídeos heterólogos a partir de bactérias. A invenção também diz respeito à polipeptídeos recombinantes produzidos por meio de procariotos e os respectivos usos desses.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[3] A secreção de polipeptídeos heterólogos para o espaço periplasmático da *E. coli* e outros procariotos ou para o meio de cultura destes está sujeita a uma variedade de parâmetros. Normalmente, os vetores para a secreção de um polipeptídeo de interesse são desenvolvidos para posicionar o DNA codificante de uma sequência sinal de secreção 5' no DNA que codifica o polipeptídeo de interesse.

[4] Assistiu-se nos últimos anos crescentes promessas da utilização de polipeptídeos heterólogos, por exemplo, anticorpos, como agentes diagnósticos e terapêuticos para diversos distúrbios e doenças. Muitas pesquisas e aplicações clínicas requerem grandes quantidades de polipeptídeo funcional, exigindo assim uma produção de polipeptídeo aumentada, e em sistemas econômicos. Particularmente útil é a produção recombinante de anticorpos, usando uma variedade de hospedeiros de expressão, que vão desde procariotos, como a *E. coli* ou *B. subtilis*, a leveduras, plantas, células de inseto e células de mamíferos. Kipriyanov e Little (1999) *Mol. Biotech.* 12:173-

201.

[5] Em comparação com outros sistemas de produção de polipeptídeos, as bactérias, especialmente a *E. coli*, oferece muitas vantagens exclusivas. As matérias-primas utilizadas (isto é, células bacterianas) são de baixo custo e de fácil cultivo, reduzindo assim o custo de produtos. Os hospedeiros procarióticos crescem muito mais rápido do que, por exemplo, células de mamíferos, permitindo análises mais rápidas das manipulações genéticas. O menor tempo de geração e a facilidade de intensificação também faz da fermentação bacteriana um meio mais atrativo para a produção de grandes quantidades de proteína. A estrutura genômica e atividade biológica de muitas espécies de bactérias, incluindo a *E. coli*, têm sido bem estudadas e uma vasta gama de vetores adequados estão disponíveis, tornando a expressão de um anticorpo desejável mais conveniente. Em comparação com os eucariotos, há muito menos etapas envolvidas no processo de produção, incluindo a manipulação de genes recombinantes, transformação estável de múltiplas cópias no hospedeiro, indução da expressão e caracterização dos produtos. Pluckthun e Pack (1997) *Immunotech* 3:83-105.

[6] Diversas abordagens já foram utilizadas para produzir polipeptídeos recombinantes em bactérias. As proteínas recombinantes podem ser obtidas a partir de bactérias através do renovelamento (*refolding*) de corpos de inclusão expressos no citoplasma, ou através da expressão seguida pela secreção para o periplasma bacteriano. A escolha entre a secreção e o *refolding* é geralmente guiada por diversas considerações. A secreção é geralmente a estratégia mais rápida e mais comumente utilizada para a produção de anticorpos. Kipriyanov e Little (1999), *supra*.

[7] Expressão de anticorpos em sistemas procarióticos pode ser realizada em diferentes escalas. As culturas em frasco-agitado (na faixa de 2-5 litros) geram tipicamente menos do que 5 mg/litro de produtos. Carter *et al.*

(1992) *Bio/Technology* 10:12-16 desenvolveram um sistema de fermentação de alta densidade de células na qual a expressão em alto nível (até 2 g/litro) de fragmentos de anticorpo foi obtida. Os títulos em grama por litro dos Fab's obtidos por Cárter *et al.* é em grande parte devido as densidades de células mais elevadas resultantes do ambiente controlado de forma mais precisa no fermentador quando comparado com os frascos de agitação simples. O sistema contém um *operon* bicistrônico concebido para coexpressar os fragmentos de cadeia leve e cadeia pesada. O *operon* bicistrônico está sob o controle de um único promotor *phoA* de *E. coli* que é indutível pela privação do fosfato. Cada cadeia de anticorpo é precedida pela sequência sinal da enterotoxina II estável ao calor (stII) de *E. coli* para direcionar a secreção para o espaço periplásmico.

[8] Para revisões gerais da produção de anticorpos em *E. coli*, vide Pluckthun e Pack (1997) *Immunotech* 3:83-105; Pluckthun *et al.* (1996) em: *ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH*, págs. 203-252 (Oxford Press); Pluckthun (1994) em: *HANDBOOK OF EXP PHARMCOL VOL 3: THE PHARMCOL OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, págs. 269-315 (ed. M. Rosenberg & G.P. Moore; Springer-Verlag, Berlim).

[9] Muitos ensaios biológicos (por exemplo, cristalografia de raios X) e aplicações clínicas (tais como terapia proteica) necessitam de grandes quantidades de proteína. Consequentemente, existe a necessidade de sistemas simples e de alto rendimento para a produção de polipeptídeos heterólogos devidamente montados, solúveis e funcionais, tais como anticorpos.

[10] Todas as referências citadas no presente, incluindo patentes e publicações, são incorporadas ao presente pela referência em sua totalidade.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[11] A invenção fornece um novo meio para aumentar a produção de proteínas heterólogas compreendendo a utilização de uma nova região de iniciação da tradução (TIR) variante, incluindo TIRs variantes compreendendo peptídeos-sinal de secreção co-traducionais (peptídeo sinal que direciona a translocação em uma forma co-traducional) e/ou TIRs variantes que compreendem peptídeos-sinal de secreção pós-traducionais (peptídeo sinal que direciona a translocação em uma forma pós-traducional). Além disso, é demonstrada na presente invenção a produção aumentada de anticorpos utilizando vetores compreendendo a cadeia leve de anticorpo operacionalmente ligada a uma TIR compreendendo um peptídeo sinal de secreção co-ou pós-traducional e uma cadeia pesada de anticorpo operacionalmente ligada a uma (TIR) compreendendo um peptídeo sinal de secreção co-traducional para o pico de expressão. Novas TIRs variantes também são fornecidas no presente.

[12] Em um aspecto, a invenção fornece regiões de iniciação da tradução (TIRs) variantes. Em alguns exemplos de realização, a variante compreende uma região de iniciação da tradução variante (em alguns exemplos de realização, uma sequência sinal de secreção pós-traducional procariótica ou uma sequência sinal de secreção co-traducional procariótica). Em alguns exemplos de realização, a variante compreende ácidos nucleicos variantes de uma sequência sinal de secreção, tal como *PhoA*, *MalE*, *DsbA* ou *STII*. Em alguns exemplos de realização, a variante compreende ainda um sítio de restrição *MlaI*, *BssHII*, ou *XbaI*. Em alguns exemplos de realização, a variante compreende uma região de iniciação da tradução variante compreendendo uma sequência mostrada na Tabela 3.

[13] Em um aspecto, a invenção fornece sequências sinal de secreção variantes. Em alguns exemplos de realização, a sequência sinal de

secreção é uma sequência sinal de secreção pós-traducional procariótica ou uma sequência sinal de secreção co-traducional procariótica. Em alguns exemplos de realização, a sequência sinal de secreção é uma sequência sinal de secreção pós-traducional eucariótica ou uma sequência sinal de secreção co-traducional eucariótica. Em alguns exemplos de realização, os variantes são ácidos nucleicos variantes de uma sequência sinal de secreção PhoA, MalE, DsbA ou STII. Em alguns exemplos de realização, os variantes compreendem uma sequência sinal de secreção exibida na Tabela 3. As sequências sinal de secreção variantes da invenção são adequadas para uso, por exemplo, em qualquer um dos métodos divulgados no presente.

[14] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo compreendendo uma região de iniciação da tradução da invenção. Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução compreende a sequência exibida na Tabela 3 (por exemplo, uma das SEQ ID NOs: 1-42). Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução compreende uma das SEQ ID NOs: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42. Os polinucleotídeos são adequados para a utilização, por exemplo, em qualquer um dos métodos descritos no presente.

[15] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo compreendendo uma sequência sinal de secreção da invenção. Em alguns exemplos de realização, a sequência sinal de secreção compreende a sequência exibida na Tabela 3 (por exemplo, uma das SEQ ID NOs: 1-42).

[16] Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução compreende uma das SEQ ID NOs: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42. Os polinucleotídeos são adequados para a utilização, por exemplo, em qualquer um dos métodos descritos no presente.

[17] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo compreendendo uma região de iniciação da tradução da invenção

operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo heterólogo, em que após a expressão do polipeptídeo heterólogo em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira procariótica, por exemplo, uma célula hospedeira *E. coli*), o polipeptídeo heterólogo é enovelado e montado para formar uma polipeptídeo heterólogo biologicamente ativo. Exemplos de polipeptídeos heterólogos são adicionalmente divulgados no presente. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é uma cadeia pesada de anticorpo. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é uma cadeia leve de anticorpo. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo Fc. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo multimérico. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é um heteromultímero. Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução é qualquer região de iniciação da tradução divulgada na presente invenção, por exemplo, uma região de iniciação da tradução compreendendo a sequência exibida na Tabela 3. Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução compreende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-42. Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução compreende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-14, 36-39, 41-42. Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal variante da STII, Dsbl, PhoA ou MalE.

[18] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo compreendendo (1) uma primeira região de iniciação da tradução (TIR) operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um primeiro polipeptídeo heterólogo, em que a TIR compreende uma sequência sinal de secreção de co-tradução procariótica; e (2) uma segunda TIR operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um segundo heterólogo, em que a segunda TIR compreende uma sequência sinal de

secreção de co-tradução ou pós-tradução procariótica, em que após a expressão do anticorpo em uma célula hospedeira, o primeiro e segundo polipeptídeos heterólogos são enovelados e montados para formar um complexo de polipeptídeo biologicamente ativo.

[19] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica um anticorpo, em que o dito polinucleotídeo comprehende: (1) uma primeira região de iniciação da tradução da invenção operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada de anticorpo e (2) uma segunda região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a uma polinucleotídeo codificante de uma cadeia leve de anticorpo, em que após expressão do anticorpo em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira procariótica, por exemplo, uma célula hospedeira *E. coli*), as cadeias pesadas e leves são enoveladas e montadas para formar um anticorpo biologicamente ativo.

[20] Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal de secreção procariótica co-traducional (por exemplo, uma sequência sinal que direciona a tradução através do peptídeo de reconhecimento do sinal). Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da STII ou DsbA. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da DsbA. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da PhoA ou MalE. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-10 e 36-42. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-10 e 36-29 e 41 e 42. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução

compreende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-42. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução comprehende uma das SEQ ID NOs: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.

[21] Em alguns exemplos de realização, a segunda região de iniciação da tradução comprehende (i) uma sequência sinal de secreção procariótica co-traducional ou sequência sinal de secreção procariótica pós-traducional (por exemplo, uma sequência sinal que direciona a tradução através da via sec). Em alguns exemplos de realização, a segunda região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da STII, DsbA, MalE ou PhoA. Em alguns exemplos de realização, a segunda região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da PhoA ou MalE. Em alguns exemplos de realização, a segunda região de iniciação da tradução comprehende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-42. Em alguns exemplos de realização, a segunda região de iniciação da tradução comprehende uma das SEQ ID NOs: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.

[22] Em alguns exemplos de realização, o polinucleotídeo codificante de um anticorpo comprehende adicionalmente: (3) uma terceira região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo Fc. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da STII, PhoA ou DsbA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da DsbA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da PhoA.

[23] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo comprehendendo (1) uma primeira região de iniciação da tradução (TIR) operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada de anticorpo, em que a TIR comprehende uma sequência sinal de secreção

procariótica co-traducional; e (2) uma segunda TIR operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve de anticorpo, em que a segunda TIR comprehende uma sequência sinal de secreção procariótica de co-tradução ou pós-tradução, em que após a expressão do anticorpo em uma célula hospedeira, as cadeias pesada e leve são dobradas e montadas para formar um anticorpo biologicamente ativo.

[24] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica um fragmento anticorpo (tal como fragmento de anticorpo monovalente), em que o dito polinucleotídeo comprehende: (1) uma primeira região de iniciação da tradução da invenção operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada de anticorpo; (2) uma segunda região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a uma polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve de anticorpo; e (3) uma terceira região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo Fc, em que após expressão do anticorpo em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira procariótica), a cadeia leve, cadeia pesada e polipeptídeo Fc são enovelados e montados para formar um anticorpo biologicamente ativo (tal coo um anticorpo de braço único). Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal de secreção procariótica co-traducional ou uma sequência sinal de secreção procariótica pós-traducional. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal STII, PhoA, MalE ou DsbA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da DsbA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende uma sequência sinal da PhoA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução comprehende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-42. Em alguns exemplos

de realização, a terceira região de iniciação da tradução compreende uma das SEQ ID NOs: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.

[25] Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo que codifica um anticorpo, em que o dito polinucleotídeo compreende: (1) uma primeira região de iniciação da tradução da invenção operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada de anticorpo, em que a primeira região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal STII ou DsbA; e (2) uma segunda região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a uma polinucleotídeo codificante de uma cadeia leve de anticorpo, em que a segunda região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal STII, DsbA, MalE ou PhoA, em que após expressão do anticorpo em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira procariótica), as cadeias pesadas e leves são enoveladas e montadas para formar um anticorpo biologicamente ativo. Em alguns exemplos de realização, a primeira região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal DsbA e a segunda região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal MalE ou PhoA. Em alguns exemplos de realização, o polinucleotídeo codificante de um anticorpo compreende adicionalmente: (3) uma terceira região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo Fc. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal da STII, PhoA ou DsbA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal da PhoA. Em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal da DsbA.

[26] Em alguns exemplos de realização, a força traducional da dita região de iniciação da tradução variante é menor do que a força traducional da região de iniciação da tradução tipo selvagem. Em alguns exemplos de

realização, a força traducional da dita região de iniciação da tradução variante é maior do que a força traducional da região de iniciação da tradução tipo selvagem. Em alguns exemplos de realização, a sequência de aminoácidos da região de iniciação da tradução variante não é alterada em relação a sequência de aminoácidos do tipo selvagem. Em alguns exemplos de realização, a sequência de aminoácidos da região de iniciação da tradução variante é alterada em relação a sequência de aminoácidos do tipo selvagem. Em alguns exemplos de realização, a região de iniciação da tradução inclui uma sequência sinal procariótica. Em alguns exemplos de realização, a primeira e segunda região de iniciação da tradução (e em alguns exemplos de realização, a terceira região de iniciação da tradução) fornecem forças traducionais aproximadamente iguais. Em alguns exemplos de realização, a força de tradução relativa é de cerca de um ou dois. Em alguns exemplos de realização, a força de tradução relativa é de aproximadamente um. Em alguns exemplos de realização, a força de tradução relativa é de aproximadamente dois. Em alguns exemplos de realização, a força de tradução relativa é um e/ou dois. Em alguns exemplos de realização, a força de tradução relativa é de cerca de três a cerca de quatro. Em alguns exemplos de realização, a força de tradução relativa é selecionada a partir de um ou mais de um, dois, três, quatro, cinco, ou mais (tal como seis, sete ou mais).

[27] Em alguns exemplos de realização, o polinucleotídeo da invenção compreende ainda um promotor operacionalmente ligado ao polipeptídeo heterólogo. Em alguns exemplos de realização, o promotor é um promotor procariótico selecionado a partir do grupo consistindo em phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara, trp e promotor T7. Em alguns exemplos de realização, o promotor é um promotor PhoA. Em alguns exemplos de realização que envolvem a expressão das cadeias pesada e leve de anticorpo, o polinucleotídeo compreende adicionalmente de: (a) um primeiro promotor, em

que o primeiro promotor está operacionalmente ligado a uma cadeia leve e (b) um segundo promotor, em que o segundo promotor está operacionalmente ligado a uma cadeia pesada. Em alguns exemplos de realização, os promotores primeiro e segundo são ambos promotores *phoA*. Em alguns exemplos de realização que envolvem a expressão das cadeias pesada e leve de anticorpo e do polipeptídeo *Fc*, o polinucleotídeo compreende ainda (c) um terceiro promotor, em que o terceiro promotor está operacionalmente ligado a um polipeptídeo *Fc*. Em alguns exemplos de realização, o terceiro promotor é um polipeptídeo *Fc*.

[28] Ao expressar polipeptídeos que compreendem mais do que um polipeptídeo (por exemplo, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada e cadeia leve), o polinucleotídeo para a expressão do polipeptídeo pode ser um polinucleotídeo policistrônico (isto é, um único polinucleotídeo que contém e expressa múltiplos *cistrons* sob o controle regulatório de um único promotor). Um exemplo comum de um vetor policistrônico é um vetor “bicistrônico” que contém e expressa dois polipeptídeos diferentes sob o controle de um promotor. Após a expressão de um vetor bicistrônico ou vetor policistrônico, várias regiões de codificação (por exemplo, genes) são primeiro transcritas como uma única unidade transcripcional, e, em seguida, traduzidas separadamente. Um *cistron* refere-se a um elemento genético sensivelmente equivalente a uma unidade de tradução compreendendo a sequência nucleotídica codificante de uma cadeia de polipeptídeos e regiões de controle adjacentes (incluindo, por exemplo, uma TIR). Em outros exemplos de realização, o polinucleotídeo pode compreender *cistrons* separados, que se referem a um único polinucleotídeo compreendendo pelo menos dois pares separados de promotor-*cistron*, em que cada *cistron* está sob o controle de seu próprio promotor. Após a expressão de um vetor de expressão em *cistrons* separados, ambos os processos de transcrição e tradução dos genes

diferentes ocorrem de forma separada e independente. Em outros exemplos de realização, o polinucleotídeo pode compreender uma porção policistrônica e uma porção de *cistron* separado.

[29] Em um aspecto adicional, a invenção fornece vetores compreendendo o polinucleotídeo da invenção. Em alguns exemplos de realização, os vetores são vetores de expressão.

[30] Em um aspecto adicional, a invenção fornece composições compreendendo um ou mais polinucleotídeos da invenção e um veículo. Em uma realização o veículo é farmaceuticamente aceitável.

[31] Em um aspecto, a invenção fornece células hospedeiras compreendendo um polinucleotídeo ou vetor da presente invenção. Em alguns exemplos de realização, as células hospedeiras compreendem o polinucleotídeo da invenção codificante de um anticorpo (em alguns exemplos de realização, um anticorpo biespecífico ou de apenas um braço). A célula hospedeira pode compreender um ou mais polinucleotídeos que coletivamente codificam o anticorpo. Um vetor pode ser de qualquer tipo, por exemplo, um vetor recombinante, tal como um vetor de expressão. Pode ser utilizada qualquer uma de uma variedade de células hospedeiras. Em uma realização, uma célula hospedeira é uma célula procariótica, por exemplo, *E. coli*. Em alguns exemplos de realização, a *E. coli* é de uma cepa deficiente nas atividades de protease endógena. Em alguns exemplos de realização, o genótipo da *E. coli* não tem os genes *degP* e *prc* e carregam um gene *spr* mutante.

[32] Em alguns exemplos de realização, a célula hospedeira compreende ainda um polinucleotídeo que codifica uma proteína chaperona procariótica (como as proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, FkpA e/ou DsbG). Em alguns exemplos de realização, a proteína chaperona é superexpressa na célula hospedeira. Em alguns exemplos de realização, a proteína chaperona é Dsb A e/ou DsbC.

[33] Em um aspecto, a célula hospedeira compreende um ou mais polinucleotídeos que codificam coletivamente um anticorpo de braço único. Em um exemplo de realização, um único polinucleotídeo codifica (a) os componentes de cadeia leve e pesada do anticorpo de braço único, e (b) o polipeptídeo Fc. Em um exemplo de realização, um único polinucleotídeo codifica os componentes cadeia leve e polipeptídeo Fc do anticorpo de braço único, e um polinucleotídeo separado codifica o polipeptídeo da cadeia pesada. Em um exemplo de realização, um único polinucleotídeo codifica os componentes cadeia pesada e polipeptídeo Fc do anticorpo de braço único, e um polinucleotídeo separado codifica o polipeptídeo da cadeia leve do anticorpo de braço único. Em um exemplo de realização, polinucleotídeos distintos codificam o componente da cadeia leve do anticorpo de braço único, o componente da cadeia pesada do anticorpo de braço único e o polipeptídeo Fc, respectivamente.

[34] Polipeptídeos heterólogos são descritos no presente. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é um anticorpo. Em algumas realizações, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em outras realizações, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Em algumas realizações, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste de um anticorpo quimérico, anticorpo maturado por afinidade, anticorpo humanizado, e anticorpo humano. Em determinadas realizações, o anticorpo é um anticorpo biespecífico. Em certas realizações, o anticorpo é um fragmento de anticorpo. Em algumas realizações, o anticorpo é um anticorpo monovalente. Em algumas realizações, o anticorpo é um Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, ou scFv.

[35] Em alguns exemplos de realização, o anticorpo é um anticorpo de um braço (ou seja, o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve formam um único braço de ligação ao antígeno) compreendendo uma região Fc, em que a região Fc compreende um

primeiro e um segundo polipeptídeo Fc, onde o primeiro e segundo polipeptídeo Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc, que aumenta a estabilidade do referido fragmento de anticorpo quando comparado com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao antígeno.

[36] Em alguns exemplos de realização, o anticorpo se liga (em alguns exemplos de realização, se liga especificamente) a c-met. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-c-met compreende (a) um primeiro polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada possuindo a sequência:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMI
DPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVT
PLDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:43), sequência CH1, e um primeiro polipeptídeo Fc, (b) um segundo polipeptídeo compreendendo o domínio variável de cadeia leve possuindo a sequência: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKSSQSLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLL
IYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFG
QGTKVEIKR (SEQ ID NO:44), e sequência CL1, e (c) um terceiro polipeptídeo compreendendo um segundo polipeptídeo Fc, em que o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve estão presentes como um complexo e formam um braço único de ligação ao antígeno, em que o primeiro e segundo polipeptídeo Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc que aumenta a estabilidade do dito fragmento de anticorpo em comparação com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao antígeno. Em algumas realizações, o primeiro polipeptídeo compreende a sequência Fc exibida na Figura 7 (SEQ ID NO: 68) e o segundo polipeptídeo compreende a sequência Fc exibida na Figura 8 (SEQ ID NO: 47). Em algumas realizações, o primeiro polipeptídeo compreende a sequência Fc exibida na

Figura 8 (SEQ ID NO: 47) e o segundo polipeptídeo compreende a sequência Fc exibida na Figura 7 (SEQ ID NO: 68).

[37] Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-c-met compreende (a) um primeiro polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada, em que o dito polipeptídeo compreende a sequência: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMI DPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVT PLDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 45); (b) um segundo polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia leve, em que o dito polipeptídeo compreende a sequência: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLL IYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:46); e um terceiro polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo Fc, em que o polipeptídeo compreende a sequência: DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47); em que o domínio variável da cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve estão presentes como um

complexo e formam um único braço de ligação ao antígeno, em que o primeiro e segundo polipeptídeos Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc que aumenta a estabilidade do referido fragmento de anticorpo em comparação com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao antígeno.

[38] Em uma realização, o anticorpo anti-c-met compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma ou mais das sequências CDR1-HC, CDR2-HC e CDR3-HC exibidas na Figura 7 (: 52-53 & 66). Em algumas realizações, o anticorpo compreende um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma ou mais sequências CDR1-LC, CDR2-LC e CDR3-LC exibidas na Figura 7 (SEQ ID NOs: 49-51). Em algumas realizações, o domínio variável de cadeia pesada compreende a sequência FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC e HC-FR4 exibida na Figura 7 (SEQ ID NOs: 62-65). Em algumas realizações, o domínio variável de cadeia leve compreende a sequência FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC e FR4-LC exibida na Figura 7 (SEQ ID NOs: 57-60).

[39] Em alguns exemplos de realização, o anticorpo compreende pelo menos uma característica que promove heterodimerização, enquanto minimiza a homodimerização, das sequências Fc no fragmento de anticorpo. Essa(s) característica(s) melhora(m) a produtividade e/ou grau de pureza e/ou homogeneidade das populações de imunoglobulinas obtidas pelos métodos da invenção conforme descrito no presente. Em um exemplo de realização, um primeiro polipeptídeo Fc e um segundo polipeptídeo Fc encontram/interagem em uma interface. Em alguns exemplos de realização o primeiro e segundo polipeptídeo Fc se encontram em uma interface, a interface do segundo polipeptídeo Fc (sequência) compreende uma protuberância (também designado de “knob” (ou botão)) que é posicionável em uma cavidade (também designada de “hole” (ou buraco)) na primeira interface do polipeptídeo

Fc (sequência). Em uma realização, o anticorpo compreende mutações em Fc constituindo "knobs" e "holes" conforme descrito no documento WO2005/063816. Por exemplo, uma mutação "hole" pode ser um ou mais dentre T366A, L368A e/ou Y407V em um polipeptídeo Fc, e uma mutação "knob" pode ser T366W.

[40] A invenção também fornece métodos que utilizam a TIR variante e sequências sinal da invenção. Entende-se que qualquer uma das variantes da TIR, sequências sinal e polinucleotídeos descritos no presente são adequados para utilização nos métodos, por exemplo, os métodos da invenção divulgados no presente. Em um aspecto adicional, a invenção fornece métodos para a produção de um polipeptídeo heterólogo da invenção. Por exemplo, a invenção fornece métodos de fabricação de um polipeptídeo heterólogo (por exemplo, um anticorpo, que tal como definido no presente inclui um anticorpo de comprimento total e seus fragmentos), cujo método compreende o cultivo da célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo da invenção (por exemplo, um polinucleotídeo compreendendo uma região de iniciação da tradução) de modo que o polinucleotídeo é expresso, de modo que após a expressão do referido polinucleotídeo na célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira procariótica), o polipeptídeo heterólogo é enovelado para formar uma polipeptídeo heterólogo biologicamente ativo. Em realizações que envolvem a expressão de anticorpos, após a expressão do referido polinucleotídeo na célula hospedeira, as cadeias leve e pesada são enoveladas e montadas para formar um anticorpo biologicamente ativo. Em alguns exemplos de realização, o método compreende adicionalmente a recuperação do polipeptídeo heterólogo (por exemplo, um anticorpo) a partir da cultura de célula hospedeira. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é recuperado a partir do meio de cultura da célula hospedeira. Em alguns exemplos de realização, o método compreende ainda a combinação do

polipeptídeo heterólogo recuperado (por exemplo, um anticorpo) com um veículo farmaceuticamente aceitável, excipiente, ou transportador para preparar uma formulação farmacêutica compreendendo o polipeptídeo heterólogo (por exemplo, anticorpo).

[41] Em um aspecto, a invenção fornece métodos para a secreção de um polipeptídeo heterólogo de interesse a partir de uma célula, compreendendo o dito método o cultivo de uma célula hospedeira que compreende um polinucleotídeo da invenção de modo que o polinucleotídeo é expresso e o polipeptídeo heterólogo é secretado.

[42] Em um aspecto, a invenção fornece métodos para a translocação de um polipeptídeo heterólogo de interesse a partir de uma célula, compreendendo o dito método o cultivo de uma célula hospedeira que compreende um polinucleotídeo da invenção de modo que o polinucleotídeo é expresso e o polipeptídeo heterólogo é translocado.

[43] Em outro aspecto, a invenção fornece um método de otimização da secreção de um polipeptídeo heterólogo de interesse em uma célula, compreendendo o dito método, a comparação dos níveis de expressão do polipeptídeo sob o controle de um conjunto de polinucleotídeos variantes de uma região de iniciação da tradução, em que o conjunto de variantes representa uma gama de forças traducionais, e determinando da força de tradução ótima para a produção do polipeptídeo maduro. Em alguns exemplos de realização, a força tradicional ótima é menor do que a força tradicional da região de iniciação da tradução do tipo selvagem. Em alguns exemplos de realização, a força tradicional ótima é maior do que a força tradicional da região de iniciação da tradução do tipo selvagem. Em alguns exemplos de realização, os variantes compreendem variantes de polinucleotídeos de uma sequência sinal de secreção. Em alguns exemplos de realização, as sequências sinal de secreção variantes são sequências sinal da via sec e/ou

sequências sinal da via SRP. Em alguns exemplos de realização, as sequências sinal de secreção variantes são sequências sinal variantes da PhoA, MalE, DsbA, ou STII. Em alguns exemplos de realização, o variante é um ou mais dentre os variantes exibidos na Tabela 3. Em alguns exemplos de realização, o variante compreende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 1-14, 36-39, 41-42.

[44] Em um aspecto, a invenção fornece um polipeptídeo heterólogo obtido por um método da invenção conforme descrito no presente. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo heterólogo é um anticorpo.

[45] Em um aspecto, a invenção fornece usos de um polipeptídeo heterólogo gerado utilizando os métodos da invenção, na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio proliferativo celular, e/ou um distúrbio imune (tal como autoimune). O polipeptídeo heterólogo pode estar em qualquer forma descrita no presente, incluindo o anticorpo, fragmento do anticorpo, polipeptídeo (por exemplo, um oligopeptídeo), ou combinação dos mesmos.

[46] Em um aspecto, a invenção fornece usos de um polinucleotídeo da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio da proliferação celular, e/ou um distúrbio imune (tal como autoimune).

[47] Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um vetor de expressão na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio da proliferação celular, e/ou um distúrbio imune (tal como autoimune).

[48] Em um aspecto, a invenção fornece o uso de uma célula hospedeira na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio da

proliferação celular, e/ou um distúrbio imune (tal como autoimune).

[49] Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um artigo manufaturado da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio da proliferação celular, um distúrbio imune (tal como autoimune) e/ou distúrbio relacionado com a angiogênese (cicatrização).

[50] Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um kit da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio da proliferação celular, e/ou um distúrbio imune (tal como autoimune).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[51] Figura 1: Translocação de peptídeos sinal indicados através da membrana interna de bactérias. Os peptídeos sinal da proteína periplasmática de ligação a maltose (MalE) e fosfatase alcalina (PhoA) direcionam a translocação a partir do citoplasma para o periplasma de maneira pós-traducional com o auxílio do motor molecular SecA. Os peptídeos sinal da enterotoxina II estável ao calor (StII) e proteína de intercâmbio tiol:bissulfeto (DsbA) direcionam a translocação de maneira co-traducional com a ajuda da partícula de reconhecimento de sinal (SRP).

[52] Figura 2: Força da região de iniciação da translocação relativa dos peptídeos-sinal variantes. Atividade da fosfatase alcalina basal normalizada de células 27C7 carregando um vetor com uma fusão entre um peptídeo sinal da STII, MalE, PhoA, ou DsbA e o domínio maduro do gene da fosfatase alcalina (BAP) de *E. coli*. Cada barra representa uma cultura individual incubada com o substrato cromogênico PNPP e a atividade enzimática foi determinada como a absorbância daquela cultura a 410 nm menos a absorbância de uma cultura carregando um vetor vazio (pBR322). As atividades foram normalizadas pela atividade basal das células 27C7 que

carregavam o plasmídeo pPho41. As barras brancas representam variantes de peptídeos sinal com um sítio de restrição *BssHII* na posição -9 em relação ao primeiro par de bases do códon de iniciação. As barras cinzas ou listradas representam um sítio *Mlul* ou *Xba*I na posição -9, respectivamente. Todas as atividades estão representadas como a média entre sete e dez replicatas de experimentos. As barras de erro estão representadas como a incerteza na média com um limite de confiança de 95%. As diferenças na força da TIR relativa entre as barras adjacentes são todas estatisticamente significativa ($P << 0,001$). As barras representam os clones SH1.2, SH2.41, SH3.38, SH4.60, SH5.34, SH6.52, SH8.36, SL1.2, SL2.74, SL3.72, MH1.92, MH2.100, ML1.97, ML2.123, MX1.wt, MX2.15, MX3.12, MX5.37, MX6.4, MX7.25, MX8.13, MX11.34, PH1.70, PH2.64, PH3.wt, PH4.67, PH5.71, PH6.77, PL1.104, PX2.41, PX3.wt, PX5.53, PX6.15, PX8.24, PX10.23, DH1.48, DH2.wt, DH3.79, DH7.72, DL1.wt, DL2.3, DL3.37 (em ordem, da esquerda para a direita).

[53] Figura 3: Monitoramento da montagem de espécies de anticorpos com manipulação do peptídeo sinal de cadeia pesada. Células 64B4 foram cultivadas em 25 mL de meio limitante de fosfato C.R.A.P. durante 24 horas e as frações solúveis bem como os *pellets* de proteína total normalizados pela densidade óptica (DO) foram preparados para análise por SDS-PAGE. (A) As amostras a partir das células que carregam o plasmídeo pBR-SS-5D5-1.1 (SS1.1), pBR-MS-5D5-1.1 (MS1.1), pBR-DS-5D5-1.1 (DS1.1) ou pBR- PS-5D5-1.1 (PS1.1) foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (massa em kDa indicadas no lado esquerdo), transferidos para a membrana de nitrocelulose, e sondadas pela presença de espécies contendo cadeia pesada com um anticorpo α -Fc específico. As amostras solúveis (*blot* superior) consistiram de bandas putativamente identificadas correspondentes a (de cima para baixo): Anticorpo de comprimento total, pesado-pesado-leve (HHL), pesados-leve (HL) ou cadeia pesada livre (monômero de cadeia pesada). As

amostras de proteína total normalizadas (*blot* inferior) foram reduzidas com 0,2 M de DTT para romper a estrutura das ligações de bissulfeto e cada pista individual migrou para uma única banda, com uma massa aparente de ~ 49 kDa. (B) As amostras de (A) foram executadas em um gel de SDS-PAGE separado (massa em kDa indicados no lado direito), transferidas para a membrana de nitrocelulose e sondadas para complexos contendo uma cadeia leve utilizando com anticorpo α -kLC específico. As amostras solúveis (*blot* superior) consistiram de bandas putativamente identificadas correspondentes a (de cima para baixo): Anticorpo de comprimento total, HL, dímero leve-leve (LL) ou cadeia leve livre (monômero de cadeia leve). As amostras de proteína total normalizadas (*blot* inferior) foram reduzidas com 0,2 M de DTT e cada pista individual migrou para uma única banda, com uma massa aparente de ~ 25 kDa. Abreviações: S = sequência de sinal STII M = sequência de sinal da MaIE; D = sequência sinal DsbA P = sequência sinal PhoA. XX#.# (Por exemplo, DS1.1) refere-se a sequência sinal de cadeia pesada, sequência sinal de cadeia leve, TIR da cadeia pesada, TIR da cadeia leve utilizado na experiência.

[54] Figura 4: Monitoramento da montagem de espécies de anticorpos com manipulação do peptídeo sinal de cadeia leve. Células 64B4 foram cultivadas em 25 mL de meio limitante de fosfato C.R.A.P. durante 24 horas e as frações solúveis bem como os *pellets* de proteína total normalizados pela densidade óptica (DO) foram preparados para análise por SDS-PAGE. As amostras de células carregando o plasmídeo pBR-DS-5D5-1.1 (DS1.1), pBR-DS-5D5-1.2 (DS1.2), pBR-DM-5D5-1.1 (DM1.1), pBR-DM-5D5-1.2 (DM1.2), pBR-DD-5D5-1.1 (DD1.1), pBR-DD-5D5-1.2 (DD1.2), pBR-DP-5D5-1.1 (DP1.1), ou pBR-DP-5D5-1.2 foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (massa em kDa estão indicadas no lado esquerdo), transferidas para nitrocelulose, e sondadas para a presença de espécies contendo cadeia pesada ou leve com um anticorpo α -Fc ou α -kLC específico, respectivamente, tal

como indicado ao longo do lado direito nas imagens. As amostras solúveis (*blot* superior) consistiram de bandas putativamente identificadas correspondentes a (de cima para baixo): Anticorpo de comprimento total, pesado-pesado-leve (HHL), dímero pesado-leve (HL) ou cadeia pesada livre. As amostras de proteína total normalizadas (*blot* do meio, abaixo) foram reduzidas com 0,2 M de DTT para romper a estrutura das ligações de bissulfeto e cada pista individual migrou para uma única banda com massa aparente de ~ 49 kDa quando sondada com um anticorpo α -Fc. Quando sondado com um anticorpo α - κ Lc específico, todas as pistas migraram para uma banda única ou dupla, com uma massa aparente de ~ 25 kDa ou ~ 27 kDa e ~ 25 kDa. Abreviações: S = sequência de sinal STII M = sequência de sinal da MaIE; D = sequência sinal DsbA P = sequência sinal PhoA. XX#.# (Por exemplo, DS1.1) refere-se a sequência sinal de cadeia pesada, sequência sinal de cadeia leve, TIR da cadeia pesada, TIR da cadeia leve utilizado na experiência.

[55] Figura 5: Monitoramento da montagem das espécies de anticorpo ao longo do tempo a partir de fermentações de 10 L. Células 64B4 foram cultivadas até uma densidade celular elevada em uma fermentação de 10 L durante três dias com amostras tomadas em intervalos de tempo regulares (o tempo das amostras tomadas está representado acima de cada pista em horas passadas após a inoculação) a partir do qual as frações solúveis, bem como os *pellets* de proteína total normalizados pela densidade óptica (DO) foram preparados para análise SDS-PAGE. As amostras de células que carregam o plasmídeo pBR-SS-5D5-1.1 coexpressando os plasmídeos carregando chaperonas pJJ247 (SS1.1 + Chaperonas), pBR-DD-5D5-1.1 com pJJ247 (DD1.1 + de Chaperonas), pBR-DS-5D5-1.1 com pJJ247 (DM1.1 + Chaperonas), ou pBR-DP-5D5-1.1 com pJJ247 (DP1.1 + Chaperonas) foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (massa em kDa indicada no lado esquerdo), transferidas para nitrocelulose, e sondadas para a presença de

espécies contendo cadeia pesada ou leve com um anticorpo α -Fc ou α -kLc específico, respectivamente, como indicado ao longo do lado direito das imagens. As amostras solúveis (*blot* superior) consistiram de bandas putativamente identificadas correspondentes a (de cima para baixo): Anticorpo de comprimento total, trimero pesado-pesado-leve (HHL), dímero pesado-leve (HL), dímero leve-leve (LL) ou cadeia leve livre. As amostras de proteína total normalizadas (*blot* do meio, abaixo) foram reduzidas com 0,2 mM de DTT para romper a estrutura das ligações de bissulfeto e cada pista individual migrou para uma única banda com massa aparente de ~ 49 kDa quando sondada com um anticorpo α -Fc. Quando sondado com um anticorpo α -kLc específico, todas as pistas migraram para uma banda única com uma massa aparente de ~ 25 kDa. Abreviações: S = sequência de sinal STII M = sequência de sinal da MalE; D = sequência sinal DsbA P = sequência sinal PhoA. XX#.# (Por exemplo, DS1.1) refere-se a sequência sinal de cadeia pesada, sequência sinal de cadeia leve, TIR da cadeia pesada, TIR da cadeia leve utilizado na experiência.

[56] Figura 6: Acumulação da PhoA madura sob condições de indução. Células 27C7 foram cultivadas em 25 mL de meio limitante de fosfato C.R.A.P. durante 24 horas e as frações solúveis foram normalizadas pela densidade óptica (DO) e preparadas para análise SDS-PAGE. O domínio maduro do gene *phoA* de *E. coli* foi fundido com as TIRs variantes da DsbA ou STII O gel foi visualizado pela presença de proteína usando a coloração de azul de Commassie. Uma banda putativamente identificada correspondendo ao domínio maduro da PhoA (direita) apareceu em uma massa de ~ 47 kDa (massa indicada no lado esquerdo).

[57] Figura 7: representa as sequências de aminoácidos do arcabouço (FR), CDR, primeiro domínio constante (CL ou CH1) e região Fc (Fc) do MetMab (OA5D5v2). A figura divulga as sequências de cadeia leve como SEQ ID NOs 57-60, 49-51 & 61, respectivamente, por ordem de

aparecimento e as sequências de cadeia pesada como SEQ ID NOs 62-65, 52-53 & 66-68, respectivamente, por ordem de aparecimento. A sequência Fc exibida compreende mutações “hole” (cavidade) T366S, L368A e Y407V, conforme descrito no documento WO 2005/063816.

[58] Figura 8: representa uma sequência de polipeptídeo Fc (SEQ ID NO: 47) que compreende uma mutação “knob” (protuberância) T366W, conforme descrito no documento WO 2005/063816. Em um exemplo de realização, um polipeptídeo Fc compreendendo esta sequência forma um complexo com um polipeptídeo Fc compreendendo a sequência Fc da Fig. 7 para gerar uma região Fc.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

TÉCNICAS GERAIS

[59] As técnicas e procedimentos descritos ou mencionados no presente são de modo geral bem compreendidos e comumente empregados utilizando a metodologia convencional pelos técnicos hábeis no assunto, como, por exemplo, as metodologias amplamente utilizadas e descritas em Sambrook *et al*, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” 3^a. Edição (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, *et al.* (2003)); da série *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): “*PCR 2: A PRACTICAL APPROACH*” (M. J. MacPherson, B. D. Hames e G. R. Taylor. (1995)), Harlow & Lane, eds. (1988) “*ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE*” (R. I. Freshney. (1987)).

DEFINIÇÕES

[60] O termo “vetor”, da forma utilizada na presente invenção, refere-se a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual ele foi ligado. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a uma alça (*loop*) circular de DNA de fita dupla, ao qual, segmentos de

DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor fago. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados dentro do genoma viral. Determinados vetores são capazes de realizar replicação autônoma na célula hospedeira a qual foram introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que possuem uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos epissomais). Outros vetores (por exemplo, vetores mamíferos não epissomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira mediante a introdução na célula hospedeira, sendo, desta forma, replicado junto com o genoma hospedeiro. Adicionalmente, determinados vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles estão operacionalmente ligados. Tais vetores são denominados na presente invenção como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente, “vetores recombinantes”). Em geral, os vetores de expressão para uso em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente presentes na forma de plasmídeos. De acordo com o presente relatório descritivo, os termos “plasmídeo” e “vetor” podem ser utilizados de forma alternada, sendo que o termo “plasmídeo” é a forma de vetor mais comumente utilizada.

[61] O termo “*cistron*”, conforme utilizado no presente, refere-se a um elemento genético amplamente equivalente a uma unidade de tradução compreendendo a sequência nucleotídica codificante de uma cadeia de polipeptídeo e as regiões de controle adjacentes. “Regiões de controle adjacentes” incluem, por exemplo, uma região de iniciação da tradução (TIR; conforme definido abaixo no presente) e uma região de terminação.

[62] Um vetor de expressão “policistrônico” refere-se a um vetor único que contém e expressa múltiplos *cistrons* sob o controle regulatório de um único promotor. Um exemplo comum de vetor policistrônico é um vetor “bicistrônico” que contém e expressa dois polipeptídeos diferentes sob o controle de um promotor. Após a expressão de um vetor bicistrônico ou vetor

policistrônico, múltiplos genes são primeiramente transcritos como uma unidade transcrecional única, e, em seguida, traduzidas separadamente.

[63] Um vetor de expressão de “*cistron separado*” de acordo com a presente invenção refere-se a um único vetor que comprehende pelo menos dois pares de *cistrons*-promotores, em que cada *cistron* está sob o controle de seu próprio promotor. Após a expressão de um vetor de expressão em *cistrons* separados, ambos os processos de transcrição e tradução dos genes diferentes ocorrem de forma separada e independente.

[64] A “região de iniciação da tradução” ou TIR ou região de iniciação traducional ou sequência de iniciação da tradução, conforme utilizado no presente refere-se a uma região de ácido nucleico que proporciona a eficiência da iniciação da tradução de um gene de interesse. De modo geral, uma TIR dentro de um *cistron* específico abrange o sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e as sequências 5' e 3' ao RBS. O RBS é definido por conter, minimamente, a região de Shine-Dalgarno e o códon de iniciação (AUG). Consequentemente, uma TIR também inclui pelo menos uma porção da sequência de ácido nucleico a ser traduzida. Preferencialmente, uma TIR da invenção inclui uma sequência sinal de secreção que codifica um peptídeo sinal que precede a sequência codificante da cadeia leve ou pesada dentro de um *cistron*. Uma TIR variante contém sequências variantes (especialmente substituições) dentro da região TIR que alteram a propriedade da TIR, como a sua força de tradução tal como definido abaixo. Preferencialmente, uma TIR variante da invenção contém substituições de sequências em 2 primeiros a cerca de 14, preferivelmente cerca de 4 a 12, mais preferivelmente cerca de 6 códons da sequência sinal de secreção que precede a sequência codificante da cadeia leve ou pesada dentro de um *cistron*.

[65] O termo “força traducional” ou “força de tradução” conforme utilizado no presente, refere-se a uma medição de um polipeptídeo secretado

em um sistema de controle em que um ou mais variante(s) de uma TIR é(são) usado(s) para direcionar a secreção de um polipeptídeo e os resultados são comparados com a TIR tipo selvagem ou algum outro controle sob a mesma cultura e condições de ensaio. Sem se limitar a qualquer teoria, o termo “força tradicional” tal como é utilizado, pode incluir, por exemplo, uma medida da estabilidade do mRNA, a eficiência de ligação ao ribossomo no sítio de ligação ao ribossomo, e o modo de translocação através da membrana.

[66] A “sequência sinal de secreção” ou “sequência sinal” refere-se a uma sequência de ácido nucleico codificante de um peptídeo sinal curto que pode ser usado para direcionar uma proteína recentemente sintetizada de interesse através de uma membrana celular, geralmente a membrana interna ou membranas internas e externas de procariotes. Como tal, a proteína de interesse, tal como o polipeptídeo da cadeia leve ou cadeia pesada de imunoglobulina, é secretada para o periplasma das células hospedeiras procariotas ou para o meio de cultura. O peptídeo sinal codificado pela sequência sinal de secreção pode ser endógeno para as células hospedeiras, ou pode ser exógeno, incluindo peptídeos sinal nativos para o polipeptídeo a ser expresso. As sequências sinal de secreção estão tipicamente presentes na extremidade amino-terminal de um polipeptídeo a ser expresso, e normalmente são enzimaticamente removidas entre as etapas de biossíntese e secreção do polipeptídeo a partir do citoplasma. Assim, o peptídeo sinal geralmente não está presente em um produto de proteína madura.

[67] “Operacionalmente ligado” refere-se a uma justaposição de dois ou mais componentes, em que os componentes assim descritos estão em uma relação que lhes permitam funcionar da forma pretendida. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se ele atua em *cis* para controlar ou modular a transcrição da sequência ligada. Geralmente, mas não necessariamente, as

sequências de DNA que estão “operacionalmente ligadas” são contíguas e, quando necessárias para juntar duas regiões codificantes de proteínas ou, no caso de um líder secretor, elas são contíguas e estão dentro do quadro de leitura. Entretanto, embora um promotor operacionalmente ligado esteja geralmente localizado a montante da sequência codificante, ele não está necessariamente contíguo com esta sequência. Amplificadores (*enhancers*) operacionalmente ligados podem estar localizados a montante, dentro ou a jusante de sequências codificantes e as distâncias consideráveis a partir do promotor. A ligação é realizada por métodos recombinantes conhecidos no estado da técnica, por exemplo, usando a metodologia da PCR, pelo anelamento, ou pela ligação em sítios de restrição convenientes. Caso estes sítios de restrição convenientes não existam, então adaptadores de oligonucleotídeos sintéticos ou ligantes são utilizados de acordo com a prática convencional.

[68] “Elementos reguladores” tal como utilizado no presente, referem-se a sequências de nucleotídeos presentes em *cis*, necessárias para a transcrição e tradução de um polinucleotídeo codificantes de um polipeptídeo heterólogo em polipeptídeos. Os elementos regulatórios da transcrição normalmente compreendem um promotor a 5' da sequência do gene a ser expresso, sítios de iniciação e terminação da transcrição, e sequência sinal de poliadenilação. O termo “sítio de iniciação da transcrição” refere-se ao ácido nucleico na construção correspondente ao primeiro ácido nucleico incorporado no transcrito primário, ou seja, o mRNA precursor, o sítio de iniciação da transcrição pode se sobrepor com as sequências promotoras.

[69] Um “promotor” refere-se a uma sequência polinucleotídica que controla a transcrição de um gene ou sequência ao qual está operacionalmente ligado. Um promotor inclui sinais para a ligação da polimerase de RNA e iniciação da transcrição. Os promotores utilizados serão

funcionais no tipo celular da célula hospedeira em que a expressão da sequência selecionada é contemplada. Um grande número de promotores, incluindo promotores induzíveis, constitutivos e repressíveis a partir de uma variedade de fontes diferentes, é bem conhecido no estado da técnica (identificados em bases de dados, por exemplo, GenBank); e estes promotores estão disponíveis como, ou dentro de, polinucleotídeos clonados (a partir de, por exemplo, de depositários como a ATCC, bem como outras fontes individuais ou comerciais). Com promotores induzíveis, a atividade do promotor aumenta ou diminui em resposta a um sinal.

[70] A expressão "célula hospedeira" (ou "célula hospedeira recombinante"), conforme utilizado na presente invenção, refere-se a uma célula que foi geneticamente alterada, ou que é capaz de ser geneticamente alterada pela introdução de um polinucleotídeo exógeno, tal como por um vetor ou plasmídeo recombinante. Deve-se compreender que tais expressões são utilizadas para referirem, não apenas a uma célula individual específica, mas para os descendentes de tal célula. Pelo fato de que algumas alterações podem ocorrer em gerações sucessivas, tanto devido à mutação quanto por influências ambientais, tal descendente pode, de fato, não ser idêntica a célula-mãe, mas ainda sim está incluída no escopo da expressão "célula hospedeira", utilizada no presente.

[71] Um polipeptídeo "isolado" (por exemplo, anticorpo) é aquele que foi identificado, separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que poderiam interferir no uso diagnóstico ou terapêutico para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não-proteináceos. Em exemplos de realizações preferidas, o polipeptídeo será purificado a (1) até mais de 95% em peso de polipeptídeo, conforme determinado através do método Lowry e, de maior preferência, mais de 99%

em peso; (2) até grau suficiente para a obtenção de pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal, por meio do uso de um sequenciador do tipo “*spinning cup*”; ou (3) até a homogeneidade através de SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando azul de Coomassie™ ou, preferencialmente, coloração de prata. O polipeptídeo isolado inclui o polipeptídeo *in situ* dentro de células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o polipeptídeo isolado é preparado através de pelo menos uma etapa de purificação.

[72] Uma molécula "isolada" de ácido nucleico é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está comumente associada à fonte natural de ácido nucleico. Uma molécula de ácido nucleico isolada é diferente, sob a forma ou a configuração em que é encontrado na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas são moléculas, por conseguinte, distintas das moléculas de ácidos nucleicos naturais, uma vez que elas existem em células. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida nas células que normalmente expressam o ácido nucleico (por exemplo, ácido nucleico que codifica o anticorpo), no qual, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está localizada em um cromossomo diferente da encontrada na célula natural.

[73] Os termos “polinucleotídeo” e “ácido nucleico” são utilizados de forma alternada na presente invenção, e referem-se a polímeros de nucleotídeos de qualquer comprimento, e incluem DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser deoxiribonucleotídeos, ribonucleotídeos, nucleotídeos modificados ou bases, e/ou análogos destes, ou qualquer substrato que possa ser incorporado em um polímero pela DNA ou RNA polimerase, ou por uma reação sintética. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos

modificados, tais como nucleotídeos metilados e seus análogos. Se presente, a modificação na estrutura do nucleotídeo pode ser realizada antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídeos. Um polinucleotídeo pode ser adicionalmente modificado após a síntese, tal como por conjugação com um marcador. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "caps", substituição de um ou mais nucleotídeos de ocorrência natural com um análogo, modificações em internucleotídeos tais como, por exemplo, aquelas com ligações não carregadas (por exemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) e com ligações carregadas (tal como fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquelas que contêm frações pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, peptídeos sinal, pty-L-lisina, etc.), aquelas com intercalantes (tal como acridina, psoraleno, etc.), aquelas que contêm quelantes (tais como, metais, metais radioativos, bóro, metais oxidativos, etc.), aquelas que contêm alquilantes, aquelas com ligações modificadas (tal como ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), bem como as formas não modificadas de polinucleotídeos. Adicionalmente, qualquer um dos grupos hidroxila geralmente presentes nos açúcares podem ser substituídos, por exemplo, por grupos fosfonatos, grupos fosfatos, protegidos por grupos protetores padrão, ou ativados para preparar ligações adicionais a nucleotídeos adicionais, ou podem ser conjugados para suportes sólidos ou semi-sólidos. A extremidade terminal OH 5' e 3' pode ser fosforilada ou substituída com unidades de moléculas orgânicas de proteção ou aminas de 1 a 20 átomos de carbono. Outras hidroxilas podem ainda ser derivatizadas para grupos protetores. Os polinucleotídeos podem ainda conter formas análogas de açúcares ribose ou deoxiribose são geralmente conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcar carboxílico, açúcares α -anoméricos, açúcares

epiméricos tais como arabinose, xiloses ou lixoses, açúcares piranose, açúcares furanose, sedoheptuloses, análogos acíclicos, e análogos de nucleosídeos abásicos tais como metil-ribosídeo. Uma ou mais das ligações fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Estes grupos de ligação alternativos incluem, mas não se limitam a, realizações em que o fosfato é substituído por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal"), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquila substituída ou não-substituída (1-20 C.) contendo opcionalmente uma ligação éter (-O-), arila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila ou araldila. Nem todas as ligações no polinucleotídeo precisam ser idênticas. A descrição anterior aplica-se a todos os polinucleotídeos descritos no presente, incluindo RNA e DNA.

[74] "Oligonucleotídeo," da forma utilizada no presente, refere-se geralmente a polinucleotídeos curtos e de fita simples, geralmente sintéticos, que normalmente apresentam, mas não necessariamente, menos de cerca de 200 nucleotídeos de comprimento. Os termos "oligonucleotídeo" e "polinucleotídeo" não são mutuamente exclusivos. A descrição acima para polinucleotídeos é igualmente e completamente aplicável para oligonucleotídeos.

[75] Conforme usado no presente, "polipeptídeo" refere-se em geral aos peptídeos e proteínas a partir de qualquer fonte celular possuindo mais do que cerca de dez aminoácidos. Os polipeptídeos "heterólogos" são aqueles polipeptídeos estranhos (ou exógenos) à célula hospedeira sendo utilizada, tal como uma proteína humana produzida pela *E. coli*. Embora o polipeptídeo heterólogo possa ser procariótico ou eucariótico, ele é preferencialmente eucariótico, mais preferencialmente de mamífero, e é mais preferencialmente ainda um polipeptídeo humano. Preferencialmente, ele é produzido de forma recombinante, ou é um polipeptídeo recombinante. Os

polipeptídeos “heterólogos” são aqueles polipeptídeos estranhos (ou exógenos) à célula hospedeira sendo utilizada, tal como uma proteína humana produzida pela *E. coli*. Embora o polipeptídeo heterólogo possa ser procariótico ou eucariótico, ele é preferencialmente eucariótico, mais preferencialmente de mamífero, e é mais preferencialmente ainda um polipeptídeo humano. Preferencialmente, ele é produzido de forma recombinante, ou é um polipeptídeo recombinante.

[76] Exemplos de polipeptídeos de mamífero incluem moléculas, tais como, por exemplo, renina, um hormônio do crescimento, incluindo hormônio do crescimento humano; hormônio do crescimento bovino; fator de liberação de hormônio do crescimento; hormônio da paratireoide; hormônio estimulante da tireoide; lipoproteínas; 1-antitripsina; cadeia A da insulina; cadeia B da insulina; pró-insulina; trombopoietina; hormônio folículo estimulante; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação, tais como fator VIIIc, fator IX, fator tecidual e fator de von Willebrand; fatores anti-coagulantes tais como a proteína C; fator natriurético atrial; surfactante do pulmão; ativador do plasminogênio, como a uroquinase ou urina humana ou ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e seus variantes, como RETEVASE® e TNKASE®; bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa- e beta-; anticorpos para domínio(s) ErbB2, tais como 2C4 (WO 01/00245; hibridoma ATCC HB-12697), que se liga a uma região no domínio extracelular de ErbB2 (por exemplo, qualquer um ou mais resíduos na região aproximada do resíduo 22 até o resíduo 584 do ErbB2, inclusive), encefalinase; uma albumina do soro, tal como a albumina do soro humano; substância inibidora Muelleriana; cadeia-A da relaxina; cadeia-B da relaxina; prorelaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; proteína microbiana, como a beta-lactamase; DNase; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormônios ou fatores de

crescimento; integrina; proteína A ou D; fatores reumatoïdes; um fator neurotrófico, tal como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, -6 ou (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento neural, como NGF; cardiotrofinas (fator de hipertrofia cardíaca), como a cardiotrofina -1 (CT-1); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos, como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF), tais como o TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4, ou TGF-5; fator de crescimento similar a insulina-I e-II (IGF-I e IGF-II); des (I-3)-IGF- I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação do fator de crescimento similar a insulina,; proteínas de CD, tais como CD-3, CD-4, CD-8, e CD-19; eritropoietina,; fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética óssea (BMP); um interferon, como o interferon-alfa,-beta, e -gama; albumina do soro, tal como albumina do soro humano (HSA) ou albumina do soro bovino (BSA); fatores estimuladores de colônias (CSFs), por exemplo, M-CSF, GM -CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), por exemplo, IL-1 a IL-10; anticorpo anti-HER-2; ligante de Apo2; superóxido dismutase; receptor de células T; proteínas da superfície de membranas; fator de aceleração da deterioração; antígeno viral, tais como, por exemplo, uma porção do envelope do HIV; proteínas de transporte; receptores de *homing*; adressinas; proteínas reguladoras; anticorpos, e fragmentos de qualquer um dos polipeptídeos listados acima.

[77] Polipeptídeos preferidos no presente incluem albumina de soro humano (HSA), 2C4, fator tecidual, anti-fator tecidual, anti-CD20, anti-HER-2, heregulina, anti-IgE, anti-CD11a, anti-CD18, VEGF e receptores e anticorpos para estes, tais como rhuFab V2 e AVASTIN®, hormônio de crescimento e seus variantes, tais como hGH, receptores de hormônios de crescimento, proteína de liberação de hormônios de crescimento (GHRP), LIV-1 (EP 1.263.780), TRAIL, fator de necrose tumoral (TNF) e

anticorpos para os mesmos, receptor de TNF e anticorpos relacionados, TNF-receptor-IgG, fatores associados a receptores de TNF (TRAFs) e inibidores dos mesmos, Fator VIII, Fator VIII de domínio B, interferons como interferon-gama, fatores de crescimento de transformação (TGFs), como o TGF-beta, anti-TGF como anti-TGF-beta, ativina, inibina, anti-ativina, anti-inibina, ativadores do plasminogênio tecidual e seus variantes, tais como t-PA, RETEPLASE®, e TNKase, anti-anticorpos Fas, ligantes de Apo-2; inibidor do ligante de Apo-2; receptor de Apo-2, Apo-3, fatores apoptóticos, Ced-4, DcR3, receptor de morte e anticorpos agonistas (DR4, DR5), linfotoxina (LT), prolactina, receptor de prolactina, proteínas SOB, WISP (proteínas secretadas induzidas por Wnt), neurotoxina-3 (NT-3), fator de crescimento neural (NGF) e anti-NGF, DNAase, antígeno da hepatite, antígeno da herpes simplex, leptina, fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), tais como IGF-1 e IGF-2 e suas proteínas de ligação e receptores, tais como IGFBP-1-IGFBP-6, insulina, fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), tal como FGF-17, proteína *Toll*, ligantes de TIE, CD40 e anti-CD40, imunoadesinas, subtilisina, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), trombopoietina (TPO), interleucinas tais como IL-2, IL-12, IL-17, IL-22, IL-8, IL-9, e anticorpos para as mesmas, e antígeno específico do câncer de próstata (PSCA).

[78] Os polipeptídeos particularmente preferidos são polipeptídeos recombinantes, mais preferivelmente anticorpos, que incluem anticorpos monoclonais e anticorpos humanizados. Tais anticorpos podem ser anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos. Mais preferivelmente, estes anticorpos são anticorpos humanos ou humanizados. Mais preferencialmente ainda, o anticorpo é um anticorpo anti-c-met, anti-IgE, anti-CD18, anti-VEGF, anti-fator tecidual, anti-2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40 ou anticorpo anti-CD11a. Os fragmentos de anticorpos abrangidos na definição de polipeptídeo compreendem preferencialmente uma cadeia leve, mais preferencialmente uma

cadeia leve kappa. Tais fragmentos preferidos incluem, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂ ou fusão (LZ) F(ab')₂-zipper de leucina, e um anticorpo de braço único.

[79] “Expressão” da proteína refere-se a conversão da informação codificada em um gene para RNA mensageiro (mRNA) e depois em uma proteína.

[80] Um “imunoconjugado” (designado de maneira intercambiável por “conjugado anticorpo-droga” ou “ADC”) significa um anticorpo conjugado a um ou mais agentes citotóxicos, tais como um agente quimioterápico, um medicamento, um agente inibidor do crescimento, uma toxina (por exemplo, uma toxina de proteína, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, vegetal, fúngica ou animal, ou fragmentos destas), ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado).

[81] Um anticorpo de “bloqueio” ou anticorpo “antagonista” é aquele que inibe ou reduz a atividade biológica do antígeno ao qual se liga. Em alguns exemplos de realização, os anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas inibem de forma completa a atividade biológica do antígeno.

[82] Um “anticorpo agonista”, conforme utilizado conforme utilizado no presente, é um anticorpo que mimetiza parcialmente ou totalmente pelo menos uma das atividades funcionais de um polipeptídeo de interesse (por exemplo, HGF).

[83] “Afinidade de ligação” refere-se, em geral, à força da soma total de interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (tal como anticorpo) e seu parceiro de ligação (tal como, um antígeno). A “afinidade de ligação” a menos que indicado de outro modo, refere-se a afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação de 1:1 entre os membros do par ligante (por exemplo, anticorpo e antígeno). A afinidade da molécula X para seu parceiro Y pode geralmente ser representada

pela constante de dissociação (Kd). Desejavelmente a Kd é de 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , ou mesmo 1×10^{-10} ou mais forte. A afinidade pode ser medida através de métodos conhecidos no estado da técnica, incluindo os métodos descritos na presente invenção. Anticorpos de baixa afinidade ligam de forma fraca o antígeno e tendem a dissociar rapidamente, enquanto os anticorpos de alta afinidade ligam o antígeno de forma mais forte e permanecem ligados por mais tempo. Uma variedade de métodos para mensurar a afinidade de ligação é conhecida no estado da técnica, no qual qualquer um destes métodos pode ser utilizado para os propósitos da presente invenção. Exemplos de realização especificamente ilustrativos são descritos a seguir.

[84] Em um exemplo de realização, o "Kd" ou " valor de Kd " de acordo com a presente invenção é mensurado pela realização de um teste de ligação com antígeno radiomarcado (RIA) com a versão Fab de um anticorpo de interesse e seus抗ígenos conforme descrito pelo seguinte ensaio que mensura a afinidade de ligação em solução de Fabs para抗ígenos pelo equilíbrio do Fab com uma concentração mínima de antígeno marcado com I^{125} , na presença de uma titulação seriada de antígeno não marcado e, em seguida, capturando os抗ígenos ligados com uma placa revestida com anticorpos anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para estabelecer as condições para o ensaio, placas de microtitulação (Dynex) são revestidas durante a noite com 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticorpo anti-Fab (Cappel Labs), em 50 mM de carbonato de sódio (pH 9,6) e, em seguida, é feito o bloqueio com albumina bovina 2% (p/v) em PBS por duas a cinco horas à temperatura ambiente (cerca de 23 °C). Em uma placa não adsorvente (Nunc # 269620), 100 pM ou 26 pM de antígeno-[I^{125}] são misturados com diluições seriadas de um Fab de interesse (por exemplo, coerente com a avaliação do anticorpo anti-VEGF, Fab-12 em Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). 57:4593-4599). A Fab de interesse é, em seguida, incubada durante a noite, no

entanto, a incubação pode continuar por um período maior (por exemplo, cerca de 65 horas) para garantir que o equilíbrio seja alcançado. Posteriormente, as misturas são transferidas para a placa de captura para a incubação em temperatura ambiente (por exemplo, por uma hora). A solução então é retirada e a placa lavada por oito vezes, com 0,1% de Tween-20 em PBS. Após as placas estarem secas, 150 μ l/poço de cintilante (MicroScint-20; Packard) é adicionado, e as placas são contadas em um contador *TOPCOUNT gamma* (Packard) por dez minutos. As concentrações de cada Fab que resultam em uma ligação menor ou igual a 20% da ligação máxima são escolhidas para a utilização em ensaios de ligação competitivos. De acordo com outro exemplo de realização, Kd ou valor de Kd é mensurado pelo ensaio de ressonância plasmônica de superfície utilizando um BIACoreTM-2000 ou BIACoreTM-3000 (BIACore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C com *chips* CM5 de antígeno imobilizado ~ 10 Unidades de Resposta (RU). Resumidamente, *chips* biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACore Inc.) são ativados com cloridrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisucinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antígeno é diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, em 5 μ g/ml (~ 0,2 μ M) antes de ser injetado a uma velocidade de fluxo de 5 μ l/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção do antígeno, etanolamina 1M é adicionada para bloquear grupos que não reagiram. Para a mediação cinética, diluições seriadas em duplicatas de Fab (0,78 nM e 500 nM) são injetadas em PBS com 0,05% de Tween-20 (PBST) a 25 °C em uma taxa de fluxo de cerca de 25 μ l/min. Em alguns exemplos de realização, as seguintes modificações são usadas para o método ensaio da ressonância plasmônica de superfície: o anticorpo é imobilizado ao *chip* biosensor CM5 para atingir cerca de 400 RU, e para as medições cinéticas, diluições seriadas de duas vezes da proteína-alvo são injetadas em tampão PBST a 25 °C com uma vazão de cerca de 30 μ l/minuto. A velocidade de associação (k_{on}) e a velocidade de

dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação simples um-pará-um de Langmuir (*BIAcore Evaluation Software* versão 3.2) pelo ajuste simultâneo de sensogramas de associação e dissociação. A constante do equilíbrio de dissociação (K_d) é calculada como a relação k_{off}/k_{on} . Vide, por exemplo., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881. Se a medida for superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ pelo ensaio de ressonância plasmônica descrito acima, então a constante de associação pode ser determinada por uma técnica de inibição (*quenching*) de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição das emissões de intensidade de fluorescência (excitação= 295 nm; Emissão = 340 nm, banda de passagem=16 nm) a 25 °C de 20 nM de um anticorpo anti-antígeno (na forma de Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes do antígeno mensurado em espectrômetro, tal como um espectrofotômetro equipado com válvula do tipo *stop-flow* (Aviv Instruments) ou um espectrofotômetro SLM-Aminco série 8000 (ThermoSpectronic), com agitador de cuveta.

[85] Uma “constante de associação”, “velocidade de associação” ou “taxa de associação” ou “ k_{on} ”, de acordo a presente invenção também pode ser determinada utilizando o mesmo ensaio de ressonância plasmônica descrito acima usando um BIAcoreTM-2000 ou BIAcoreTM-3000 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C com um chip CM5 de antígeno imobilizado a ~ 10 unidades de resposta (RU). Resumidamente, *chips* biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) são ativados com cloridrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisucinimida (NHS) de acordo com as instruções do fornecedor. O antígeno é diluído com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,8, em 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes de ser injetado a uma velocidade de fluxo de 5 µl/minuto para atingir aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Após a injeção do antígeno, etanolamina 1M é adicionada para bloquear grupos que não reagiram. Para a mediação cinética, diluições seriadas de duas vezes de Fabs (0,78 nM e 500

nM) são injetadas em PBS com 0,05% de Tween-20 (PBST) a 25 °C em uma taxa de fluxo de cerca de 25 μ l/min. Em alguns exemplos de realização, as seguintes modificações são usadas para o método ensaio da ressonância plasmônica de superfície: o anticorpo é imobilizado ao *chip* biosensor CM5 para atingir cerca de 400 RU, e para as medições cinéticas, diluições seriadas de duas vezes da proteína-alvo são injetadas em tampão PBST a 25 °C com uma vazão de cerca de 30 μ l/minuto. A velocidade de associação (k_{on}) e a velocidade de dissociação (k_{off}) são calculadas utilizando um modelo de ligação simples um-para-um de Langmuir (*BIAcore Evaluation Software* versão 3.2) pelo ajuste simultâneo de sensogramas de associação e dissociação. A constante do equilíbrio de dissociação (K_d) foi calculada como a relação k_{off}/k_{on} . Vide, por exemplo., Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881. Entretanto, se a constante de associação (*on-rate*) for superior a 10^6 M⁻¹ S⁻¹ pelo ensaio de ressonância plasmônica descrito acima, então é preferível que a constante de associação seja determinada por uma técnica de inibição (*quenching*) de fluorescência que mede o aumento ou a diminuição das emissões de intensidade de fluorescência (excitação= 295 nm; Emissão = 340 nm, banda de passagem=16 nm) a 25 °C de 20 nM de um anticorpo anti-antígeno (na forma de Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes do antígeno mensurado em espectrômetro, tal como um espectrofotômetro equipado com válvula do tipo *stop-flow* (Aviv Instruments) ou um espectrofotômetro SLM-Aminco série 8000 (ThermoSpectronic), com agitador de cuveta.

[86] Um “anticorpo nu” é um anticorpo não conjugado a uma molécula heteróloga, tal como uma fração citotóxica ou um radiomarcador.

[87] Um anticorpo possuindo uma “característica biológica” de um determinado anticorpo é aquele que possui uma ou mais características biológicas do qual os anticorpos que o distinguem de outros anticorpos se

ligam ao mesmo antígeno.

[88] Com o intuito de selecionar anticorpos que se ligam a um epítopo sobre um antígeno ligado a um anticorpo de interesse, pode ser executado um ensaio de bloqueio cruzado rotineiro, tal como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow e David Lane (1988).

[89] Para aumentar a meia vida do anticorpo ou polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos da presente invenção, pode-se incorporar um epítopo ligado ao receptor de recuperação do anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na patente US 5.739.277. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico que codifica o receptor de recuperação do epítopo de ligação pode estar ligado no quadro de leitura a um ácido nucleico que codifica uma sequência de polipeptídeo da presente invenção de modo que a proteína de fusão expressa pela molécula de ácido nucleico desenvolvida por engenharia genética compreende o receptor de recuperação do epítopo de ligação e uma sequência polipeptídica da presente invenção. Da forma como utilizada no presente, a expressão “epítopo de ligação ao receptor de recuperação” designa um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da meia vida *in vivo* no soro da molécula de IgG (por exemplo, Ghetie *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), Tabela 1). Anticorpos com substituições em uma região Fc deste e aumento na meia-vida sérica também estão descritos nos documentos WO 00/42072, WO 02/060919; e em Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). Em outra realização, a meia-vida sérica também pode ser aumentada, por exemplo, anexando outras sequências de polipeptídeos. Por exemplo, anticorpos ou outros polipeptídeos úteis nos métodos da presente invenção podem ser anexados à albumina do soro ou

uma porção da albumina do soro que se liga aos receptores FcRn ou um peptídeo que se liga a albumina, para que albumina do soro se ligue ao anticorpo ou polipeptídeo, por exemplo, as sequências polipeptídicas divulgadas no documento WO 01/45746. Em um exemplo de realização, o peptídeo da albumina do soro a ser acoplado compreende a sequência de aminoácidos DICLPRWGCLW (: 48). Em outro exemplo de realização, a meia-vida de um Fab é aumentada por estes métodos. Vide também, Dennis, M. S., *et al*, *J. Biol. Chem.* 277(38):35035-35043 (2002) para sequências de peptídeo que se ligam a albumina. “Fragmento” significa uma parte de um polipeptídeo ou molécula de ácido nucleico que contém, preferencialmente, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais de todo o comprimento da molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo de referência. Um fragmento pode conter 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100, 200, 300, 400, 500, 600, ou mais nucleotídeos ou 10, 20, 30, 40, 50, 60 , 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 ou mais aminoácidos.

[90] Os termos “anticorpo” e “imunoglobulina” são utilizados de forma alternada e no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais de comprimento total ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos contanto que eles apresentem a atividade biológica desejada), e podem incluir ainda determinados fragmentos de anticorpos (conforme descrito em maiores detalhes na presente invenção). Um anticorpo pode ser humano, humanizado e/ou maturado por afinidade.

[91] O termo “variável” refere-se ao fato de que certas partes dos domínios variáveis diferem amplamente na sequência entre os anticorpos e são utilizados na especificidade de ligação de cada anticorpo específico para o seu antígeno específico. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente ao longo de todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela é

tipicamente concentrada em três segmentos denominados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis, tanto nos domínios variáveis de cadeia leve como de cadeia pesada. As porções mais bem conservadas de domínios variáveis são denominadas de arcabouços (ou regiões estruturais ou *frameworks* (FR)). Os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas nativas compreendem 4 regiões de FRs, adotando em grande parte uma configuração em folha-β, conectadas por 3 CDRs, que formam conexões em alças (*loops*) e, em alguns casos, fazem parte da estrutura em folha-β. As CDRs de cada cadeia são mantidas juntas em grande proximidade pelas regiões FR e com as CDRs da outra cadeia, contribuindo para a formação do sítio de ligação ao antígeno dos anticorpos (vide Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, *Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD*, (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como a participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpos.

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

[93] “Fv” é o menor fragmento de anticorpo, que contém um sítio completo de reconhecimento e de ligação de antígenos. Em uma cadeia de duas espécies de Fv, esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e em um de cadeia leve em estreita associação não-covalente. Em uma única cadeia de Fv, um domínio variável da cadeia pesada e um da cadeia leve podem ser covalentemente ligados por um peptídeo

ligante flexível de tal forma que a cadeias leves e pesadas possam se associar em uma estrutura "dimérica" análoga àquela do Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação aos抗ígenos sobre a superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem a especificidade de ligação para o anticorpo. Entretanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv que comprehende apenas três CDRs específicos para um抗ígeno), possui a capacidade de reconhecer e ligar ao抗ígeno, embora em menor afinidade do que o site de ligação inteiro.

[94] O fragmento Fab também contem o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no carbóxi-terminal do domínio CH_1 de cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação da presente invenção para o Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes sustenta(m) um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ foram produzidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que possuem dobradiças de cisteínas entre si. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são também conhecidos.

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

[96] Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, os anticorpos podem ser atribuídos a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Os domínios

constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados de α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. “Fragmentos de anticorpos” compreendem uma porção de anticorpo intacto, em que a porção retém preferencialmente pelo menos um, e preferencialmente a maioria ou todas as funções normalmente associadas a essa porção quando presente em um anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', F(ab')₂ e fragmentos Fv, diacorpos, anticorpos lineares, moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos. Em uma realização, o fragmento de anticorpo compreende de um sítio de ligação ao antígeno do anticorpo intacto mantendo assim a capacidade de se ligar ao antígeno. Em outra realização, um fragmento de anticorpo, por exemplo, um que compreende a região Fc, retém ao menos uma das funções biológicas normalmente associadas com a região Fc quando presente em um anticorpo intacto, tal como a ligação de FcRn, modulação da meia vida do anticorpo, função ADCC e ligação do complemento. Em um exemplo de realização, um fragmento de anticorpo é um anticorpo monovalente que possui uma meia vida *in vivo* substancialmente similar ao de um anticorpo intacto. Por exemplo, tal fragmento de anticorpo pode compreender de um braço de ligação ao antígeno para uma sequência Fc capaz de conferir estabilidade *in vivo* ao fragmento.

[97] O termo “região hipervariável”, “HVR”, ou “HV”, quando utilizado no presente refere-se às regiões de um domínio variável de anticorpo que são hipervariáveis na sequência e/ou formam alças estruturalmente definidas. Geralmente, os anticorpos compreendem seis regiões hipervariáveis; sendo três na VH (H1, H2, H3), e três na VL (L1, L2, L3). Diversos delineamentos da região hipervariável são utilizados e englobados neste

documento. As regiões determinantes de complementaridade de Kabat (CDRs) são baseadas na variabilidade das sequências e são as mais comumente usadas (Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1991). Chothia por sua vez refere-se a localização das alças estruturais (Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). As regiões hipervariável do AbM representam um acordo entre os CDRs de Kabat e as alças (*loops*) estruturais de Chothia, e são utilizados pelo programa “Oxford Molecular’s AbM antibody modeling software”. O “contato” das regiões hipervariáveis é baseado em uma análise das estruturas de complexo cristalino disponíveis. Os resíduos de cada uma destas regiões hipervariáveis são descritas a seguir.

Alça	Kabat	AbM	Chothia	Contato
---	----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeração de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeração de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[98] As regiões hipervariáveis podem compreender “regiões hipervariáveis alongadas”, como as seguintes: 24-36 ou 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no VL e 26-35 (H1) , 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102 ou 95-102 (H3) no VH. Os resíduos do domínio variável são numerados de acordo com a Kabat *et al, supra* para cada uma dessas definições.

[99] Resíduos do “arcabouço” (ou região estrutural ou *framework*)

ou "FR" são aqueles resíduos do domínio variável que não são resíduos da região hipervariável conforme definido no presente.

[100] Formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (tal como, murino) são anticorpos químicos que contém uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que os resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano possuindo a(s) especificidade(s), afinidade(s) e/ou capacidade(s) desejada(s). Em alguns casos, resíduos da região de arcabouço (ou região estrutural - *framework region* (FR)) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Adicionalmente, anticorpos humanizados podem conter resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações podem ser feitas para refinar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas das alças (*loops*) hipervariáveis correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado poderá também compreender opcionalmente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para maiores detalhes, vide Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Veja também os artigos de revisão e as referências citadas nos mesmos: Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

[101] Os anticorpos (imunoglobulinas) “quiméricos” possuem uma porção da cadeia leve e/ou pesada que é(são) idêntica(s), ou homóloga(s), com as sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencem a uma classe ou subclasse específica de anticorpo, enquanto o restante da cadeia é idêntico, ou homólogo, com as sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies, ou que pertencem a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos destes anticorpos, desde que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente US 4.816.567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Um anticorpo humanizado, conforme utilizado na presente invenção é um subconjunto de anticorpos quiméricos.

[102] Fragmentos de anticorpo “Fv de cadeia única” ou “scFv” compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpo, no qual estes domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Geralmente, o polipeptídeo scFv compreende ainda um polipeptídeo ligante entre os domínios VH e VL , permitindo que o scFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de scFv vide Pluckthun, em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Eds Rosenburg e Moore., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315 (1994).

[103] Um “antígeno” é um antígeno predeterminado ao qual um anticorpo pode se ligar seletivamente. O antígeno alvo pode ser polipeptídeo, carboidratos, ácidos nucleicos, lipídio, ou outros haptenos de ocorrência natural ou composto sintético. Preferivelmente, o antígeno alvo é um polipeptídeo.

[104] O termo “diacorpos” refere-se a pequenos fragmentos de anticorpos com dois sítios de ligação ao antígeno, em que tais fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica ($VH - VL$). Por meio do uso de um ligante que é muito curto para permitir o pareamento

entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia, e criar dois sítios de ligação ao antígeno. Diacorpos estão descritos em maiores detalhes, por exemplo, na Patente EP 404.097; documento WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

[105] Um “anticorpo humano” é aquele que possui uma sequência de aminoácido que corresponde à sequência de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi produzido pelo uso de qualquer técnica para a produção de anticorpos humanos conforme descrito no presente. Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado, que compreende resíduos não humanos de ligação ao antígeno.

[106] Um anticorpo “maturado por afinidade” é um anticorpo que possui uma ou mais alterações em um ou mais CDRs do mesmo que resulta na melhora da afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno, comparado ao anticorpo parental que não possui tal(ais) alteração(ões). Os anticorpos maturados por afinidade preferidos possuirão afinidades nanomolares ou até picomolares para o antígeno alvo. Anticorpos maturados por afinidade são produzidos por procedimentos conhecidos no estado da técnica. Marks, *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992) descrevem a maturação por afinidade pelo método de embaralhamento (*shuffling*) do domínio VL e VH. A mutagênese aleatória de CDR e/ou resíduos da região de arcabouço (ou estrutural (*framework*)) é descrita por: Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[107] Os termos “receptor de Fc” ou “FcR” descrevem um receptor que se liga a uma região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR de sequência nativa humana. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a

um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasse Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses receptores. Receptores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (um "receptor de ativação") e Fc γ RIIB (um "receptor de inibição"), que possuem sequências similares de aminoácidos que diferem entre si principalmente em seus domínios citoplasmáticos. O receptor de ativação Fc γ RIIA possui um motivo de ativação com base em imunoreceptor tirosina (ITAM), no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição Fc γ RIIB possui um motivo de inibição com base em imunoreceptor tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático. (vide revisão em M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs são revisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e deHaas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Outros FCRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro são abrangidos pelo termo "FcR" na presente invenção. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos ao feto (Vide Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249(1994)), e regula a homeostase das imunoglobulinas. O documento WO 2000/42072 (Presta) descreve variantes de anticorpos com ligação aos FcRs melhorada ou diminuída. O conteúdo de tais publicações de patentes é especificamente incorporado ao presente pela referência. Vide também, por exemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

[108] Os métodos para medição da ligação ao FcRn são conhecidos (vide, por exemplo, Ghetie 1997, Hinton, 2004). A ligação ao FcRn humano *in vivo* e a meia vida no soro de polipeptídeos que se ligam ao FcRn humano com alta afinidade de ligação podem ser analisadas, por exemplo, em camundongos transgênicos ou transfetados em linhagens de células humanas expressando o FcRn humano, ou administrados em primatas com polipeptídeos variantes de Fc.

[109] Variantes de polipeptídeos com sequências de aminoácidos da região Fc alteradas e o aumento ou diminuição da capacidade de ligação ao C1q são descritos na Patente US 6.194.551 B1, e documento WO 99/51642. O conteúdo dessas publicações de patentes é especificamente incorporado ao presente pela referência. Vide, também, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[110] O termo "região Fc", da forma como utilizado no presente, se refere em geral a um complexo que compreende as sequências polipeptídicas da extremidade C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina, onde uma sequência polipeptídica C-terminal é aquela que é obtida pela digestão de um anticorpo intacto com a papaína. A região de Fc pode compreender sequências Fc nativas ou variantes. Embora os limites da sequência Fc da cadeia pesada de uma imunoglobulina possam variar, a sequência Fc da cadeia pesada da IgG humana é normalmente definida como se estendendo a partir de um resíduo de aminoácidos que se encontra por volta da posição Cys226, ou por volta da posição Pro230, até a região carboxi-terminal da sequência Fc. A sequência Fc de uma imunoglobulina compreende geralmente dois domínios constantes, um domínio CH2 e um domínio CH3, e compreende opcionalmente um domínio CH4. A expressão "polipeptídeo Fc" significa no presente um dos polipeptídeos que compõem uma região Fc. Um polipeptídeo Fc pode ser obtido a partir de qualquer imunoglobulina adequada, tal como os subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄, IgA, IgE, IgD ou IgM. Em algumas realizações, um polipeptídeo Fc compreende uma parte ou a totalidade de uma sequência de articulação (*hinge*) tipo selvagem (geralmente em sua extremidade N-terminal). Em algumas realizações, um polipeptídeo Fc não compreende uma sequência de articulação funcional ou tipo selvagem.

[111] Conforme utilizado na presente invenção, as expressões "anticorpo mutante" ou "variante de anticorpo" refere-se a uma sequência de

aminoácidos variante de um anticorpo no qual um ou mais resíduos de aminoácidos do anticorpo espécie-dependente foram modificados. Tais mutantes necessariamente possuem menos de 100% identidade de sequência ou similaridade com o anticorpo espécie-dependente. Em um exemplo de realização, o anticorpo mutante possuirá uma sequência de aminoácidos que contém pelo menos 75% de identidade ou similaridade na sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos de um domínio variável de cadeia leve ou pesada do anticorpo espécie-dependente, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e mais preferencialmente ainda pelo menos 95%. A identidade ou similaridade com relação a esta sequência é definida no presente como a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência candidata que é idêntica (ou seja, o mesmo resíduo) ou similar (ou seja, resíduos de aminoácido do mesmo grupo com base nas propriedades da cadeia lateral, vide abaixo) com os resíduos do anticorpo espécie-dependente, após o alinhamento das sequências e a introdução das lacunas, se necessário, para atingir a percentagem máxima de identidade de sequência. Nenhuma deleção ou inserção nas extremidades N-terminal, C-terminal ou em extensões internas da sequência de anticorpos fora do domínio variável deve ser interpretada como alteração que afeta a identidade ou similaridade da sequência.

[112] Um "distúrbio" ou "doença" é qualquer condição que possa se beneficiar de um tratamento com uma substância/molécula ou método da presente invenção. Isto inclui distúrbios ou doenças agudas e crônicas incluindo aquelas condições patológicas que predispõem o mamífero ao distúrbio em questão. Exemplos não limitantes de distúrbios que podem ser tratados na presente invenção, incluem tumores malignos e benignos; carcinoma, blastoma e sarcoma.

[113] O termo “tratamento” refere-se tanto a tratamento terapêutico quanto a medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles que necessitam de tratamento incluem indivíduos que já possuem um tumor benigno, estado pré-canceroso, ou tumor não metastático, bem como aqueles em que a ocorrência ou recorrência do câncer deve ser evitada.

[114] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um agente terapêutico para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio em um mamífero. No caso de cânceres, a quantidade terapeuticamente eficaz do agente terapêutico pode reduzir o número de células cancerosas, reduzir o tamanho do tumor primário; inibir (ou seja, reduzir até certo ponto e, preferencialmente, parar) a infiltração de células do câncer em órgãos periféricos; inibir (ou seja, reduzir até certo ponto e, de preferência, parar) a metástase tumoral, inibir, em alguma extensão, o crescimento tumoral e/ou aliviar em alguma extensão, um ou mais sintomas associados ao distúrbio. À medida que a droga pode impedir o crescimento e/ou matar as células cancerígenas já existentes, ela pode ser considerada citostática e/ou citotóxica. Na terapia para o câncer, a eficácia *in vivo* pode ser mensurada, por exemplo, avaliando o tempo de progressão da doença (TTP) e/ou determinando a taxa de resposta (RR), duração de resposta e/ou qualidade de vida.

[115] Uma “doença autoimune” de acordo com o presente, é uma doença ou distúrbio não maligno que se desenvolve a partir do, e é direcionado contra o próprio tecido de um indivíduo. As doenças autoimunes de acordo com a presente invenção excluem, especificamente, doenças ou condições malignas e cancerosas, excluindo de maneira específica o linfoma de célula B, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de células cabeludas e leucemia mieloblástica crônica. Exemplos de doenças e distúrbios auto-imunes incluem, mas não estão limitados a, respostas inflamatórias, tais como doenças inflamatórias da pele, incluindo psoríase e

dermatite (por exemplo, a dermatite atópica); esclerodermia sistêmica e esclerose; respostas associadas a doenças inflamatórias intestinais (como doença de Crohn e colite ulcerativa), síndrome do desconforto respiratório (incluindo síndrome de angústia respiratória do adulto; ARDS); dermatite; meningite, encefalite, uveíte; colite; glomerulonefrite, condições alérgicas, tais como o eczema e asma e outras condições que envolvem a infiltração de células T e resposta inflamatória crônica, atherosclerose, deficiência da adesão leucocitária, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), *diabetes mellitus* (por exemplo, *diabetes mellitus* tipo I ou *diabetes mellitus* insulino-dependente), esclerose múltipla, síndrome de Raynaud; tireoidite autoimune, encefalomielite alérgica, síndrome de Sjorgen; diabetes juvenil; e resposta imune associada com hipersensibilidade aguda e tardia mediada por citocinas e linfócitos T tipicamente encontradas na tuberculose, sarcoidose, polimiosite, granulomatose e vasculite, anemia perniciosa (doença de Addison); doenças que envolvem a diapedese de leucócitos, distúrbio inflamatório do sistema nervoso central (SNC); síndrome da lesão de múltiplos órgãos; anemia hemolítica (incluindo, mas não se limitando a crioglobulinemia ou anemia Coombs positivo), *miastenia gravis*; doenças mediadas pelo complexo antígeno-anticorpo; doença causadas por anti-membrana basal glomerular, síndrome antifosfolípides; neurite alérgica, doença de Graves; Síndrome de Lambert-Eaton; penfigoide bolhoso, pênfigo; poliendócrinopatias auto-imunes, doença de Reiter, síndrome de *stiff-man* (síndrome do “homem rígido”), doença de Behcet; arterite de células gigantes; nefrite por complexo imune, nefropatia por IgA, polineuropatias por IgM; púrpura trombocitopênica imune (ITP) ou trombocitopenia autoimune e etc.

[116] Os termos “câncer” e “canceroso” referem-se, ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que normalmente é caracterizada pelo crescimento de células de maneira não regulada. Ficam incluídos nesta

definição os cânceres benignos e malignos. Por “câncer em estágio precoce” ou “tumor em fase inicial” entende-se um câncer que não é invasivo ou metastático, ou é classificado como um câncer de estadio 0, I ou II. Exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluindo meduloblastoma e retinoblastoma), sarcoma (incluindo lipossarcoma e sarcoma de células sinoviais), os tumores neuroendócrinos (incluindo tumores carcinóides, gastrinoma e câncer de células da ilhota), mesotelioma, schwannoma (incluindo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma e leucemia linfoide ou malignidades linfoides. Exemplos mais específicos de tais cânceres incluem o câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células epiteliais escamosas), câncer de pulmão incluindo o câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e o câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), adenocarcinoma de pulmão e carcinoma escamoso de pulmão, câncer de peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago incluindo o câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer de colo do útero, câncer de ovário, câncer hepático, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama (incluindo câncer de mama metastático), câncer de cólon, câncer de reto, câncer colorretal, câncer de endométrio ou carcinoma uterino, carcinoma de glândulas salivares, câncer de rim ou câncer renal, câncer de próstata, cânceres vulvares, câncer da tiroide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pênis, câncer testicular, câncer esofágiano, tumores do trato biliar, bem como o câncer de cabeça e pescoço e mieloma múltiplo.

[117] O termo “pré-canceroso” refere-se a uma condição ou um crescimento que geralmente precede ou evolui para um câncer. Um crescimento “pré-canceroso” terá células que são caracterizadas pela regulação anormal do ciclo celular, proliferação e diferenciação, que pode ser determinado por meio de marcadores da regulação do ciclo celular, proliferação

celular ou diferenciação.

[118] Por “displasia” significa qualquer crescimento anormal ou desenvolvimento de tecidos, órgãos ou células. Preferencialmente, a displasia é de alto grau ou pré-cancerosa.

[119] Por “metástase” entende-se a propagação do câncer a partir de seu local primário para outros lugares do corpo. As células cancerosas podem fugir do tumor primário, penetrar nos vasos linfáticos e sanguíneos, circular através da corrente sanguínea, e crescer em um foco distante (metástases) em tecidos normais de outras partes do corpo. A metástase pode ser local ou distante. A metástase é um processo sequencial, depende de células tumorais que partem do tumor primário, viajando através da corrente sanguínea, e parando em um local distante. No novo local, as células estabelecem um suprimento de sangue e podem crescer até formar uma massa potencialmente letal.

[120] Ambas as vias moleculares (estimulatória e inibitória) dentro da célula do tumoral regulam esse comportamento, e as interações entre a célula tumoral e as células hospedeiras no local distantes também são significativas.

[121] A expressão "não metastática" significa um câncer que é benigno ou que permanece no local primário e que não tenha penetrado no sistema linfático ou vasos sanguíneos ou que não foi para outros tecidos além do local primário. Geralmente, o câncer não metastático é qualquer tipo de câncer que está em um estadio 0, I ou II e ocasionalmente é um câncer que está em um estadio III.

[122] Por "tumor primário" ou "câncer primário" entende-se o câncer original e não uma lesão metastática localizada em outro tecido, órgão ou localização no corpo do paciente.

[123] Por "tumor benigno" ou "câncer benigno" entende-se um

tumor que permanece localizado no local de origem e não tem a capacidade de infiltrar, invadir ou causar metástases para um local distante.

[124] Por “carga tumoral” entende-se o número de células de câncer, o tamanho de um tumor, ou a quantidade de câncer no corpo. A carga tumoral é também referida como a carga de tumor.

[125] "Número de tumor" quer dizer a quantidade de tumores.

[126] Por “indivíduo”, “sujeito” ou “paciente” entende-se um mamífero, incluindo, mas não se limitando a, um mamífero humano ou não humano, tal como bovinos, equinos, caninos, ovinos ou felinos. Preferencialmente, o indivíduo é um ser humano.

[127] O termo “terapia anticâncer” refere-se a uma terapia útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes terapêuticos anti-câncer incluem, mas não se limitam a, por exemplo, agentes quimioterápicos, agentes inibidores do crescimento, agentes citotóxicos, agentes usados na terapia de radiação, agentes anti-angiogênicos, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, e outros agentes para o tratamento do câncer, anticorpos anti-CD20, inibidores do fator de crescimento derivado de plaquetas (por exemplo, Gleevec® (mesilato de imatinibe)), um inibidor da COX-2 (por exemplo, o celecoxib), interferons, citocinas, antagonistas (por exemplo, anticorpos neutralizantes) que se ligam a um ou mais dos seguintes alvos ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA ou receptor(es) VEGF, TRAIL/Apo2, e outros agentes químicos bioativos e orgânicos e etc. Combinações destes são também contempladas pela presente invenção.

[128] A expressão “agente citotóxico”, da forma utilizada na presente invenção, indica uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa a destruição de células. A expressão é utilizada para incluir isótopos radioativos (por exemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} e Re^{186}), agentes quimioterápicos e toxinas, tais como toxinas enzimaticamente ativa de

bactérias, fungos, plantas, ou de origem animal, ou fragmentos destes.

[129] Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento do câncer. Exemplos de agente quimioterápico incluem compostos químicos úteis no tratamento do câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa e ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquila, tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona); camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecan; briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente a criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo o análogo sintético, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictiina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrossuréias, tais como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tais como os antibióticos de enedina (por exemplo, caliqueamicin, especialmente caliqueamicin gama1I e caliquemicin omegal1; vide, por exemplo, Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994); dinemicina, incluindo dinemicina A; biofosfonados, tais como clodronato, esperamicina; bem como neocarzinostatina cromóforo e cromóforos antibióticos de enedina cromoproteína relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicin, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina doxorubicina (incluindo

ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas como, por exemplo mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, esteptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabólitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamido glicosídeo; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínia; epotilona; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxiuréia; lentinan; ionidamina; maitansinóides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitacrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilidrazida; procarbazina; PSK® complexo polissacarídico (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides, tais como, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulação de nanopartículas de paclitaxel construídas em albumina ABRAXANE® (*American Pharmaceutical Partners*,

Schaumberg, Illinois), e doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucil, GEMZAR® gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbine; novantrona; teniposide, edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda, ibandronato; irinotecano (Camptosar, CPT-11) (incluindo o regime de tratamento de irinotecano com 5-FU e leucovorina), inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; capecitabina; combretastatina; VELCADE bortezomib; REVLIMID lenalidomide; leucovorin (LV); oxaliplatina, incluindo o regime de tratamento oxaliplatina (FOLFOX); inibidores da PKC-alfa, Raf, H-Ras e EGFR (por exemplo, o erlotinib (Tarceva®) e EVGF-A que reduz a proliferação celular e os sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima mencionados.

[130] Também estão incluídos nesta definição os agentes anti-hormonais que agem regulando ou inibindo a ação hormonal tal como antiestrógenos e os moduladores seletivos do receptor do estrógeno (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo o tamoxifeno NOLVADEX®, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifeno FARESTON®; inibidores da aromatase que inibem enzima aromatase, que regula a produção do estrógeno nas glândulas adrenais como, por exemplo, 45-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestane AROMASIN®, formestan, fadrozole, vorozole RIVISOR®, letrozole FEMARA®, e anastrozole ARIMIDEX® e anti-andrógenos, tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina, bem como troxacitabina um nucleosídeo 1,3-dioxolano análogo a citosina; oligonucleotídeos *antisense*, particularmente aqueles que inibem a expressão dos genes nas vias de sinalização envolvida na proliferação celular

aberrante, como, por exemplo, PKC-alfa, Raf e H-Ras; ribozimas, tal como um inibidor da expressão do VEGF (por exemplo, ribozima ANGIOZYME®) e um inibidor da expressão de HER2, vacinas como as vacinas para terapia gênica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN ® e vacina VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN®; inibidor da topoisomerase 1; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina e Esperamicinas (vide Patente US 4.675.187), e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos compostos acima.

[131] O termo “pró-droga”, com utilizado na presente invenção, designa uma forma precursora ou derivativa de uma substância farmaceuticamente ativa que é menos citotóxica para células tumorais em comparação com a droga parental e é capaz de ser enzimaticamente ativada ou convertida na forma parental mais ativa. Vide, por exemplo, Wilman, “*Prodrugs in Cancer Chemotherapy*” *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615a Reunião de Belfast (1986) e Stella *et al.*, *Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, *Human Press* (1985). As pró-drogas de acordo com a presente invenção incluem, mas não se limitam a, pró-drogas que contêm fosfato, pró-drogas que contêm tiofosfato, pró-drogas que contêm sulfato, pró-drogas que contêm peptídeos, pró-drogas modificadas com D-aminoácidos, pró-drogas glicosiladas, pró-drogas que contêm beta-lactama, pró-drogas que contêm fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-drogas que contêm fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outras pró-drogas de 5-fluorouridina que podem ser convertidas na droga livre citotóxica mais ativa. Exemplos de drogas citotóxicas que podem ser derivatizadas na forma de pró-droga para uso na presente invenção incluem, mas sem limitar-se a, aqueles agentes quimioterápicos descritos anteriormente.

[132] O termo "radioterapia" significa o uso de raios gama ou raios

beta direcionados para induzir um dano suficiente em uma célula de modo a limitar a sua capacidade de funcionar normalmente, ou para destruir completamente a célula. Será apreciado que existem diversas maneiras conhecidas no estado da técnica para determinar a dose e a duração do tratamento. Os tratamentos típicos são fornecidos por uma administração única e as doses típicas variam de 10 a 200 unidades (Grays) por dia.

[133] Um polipeptídeo “biologicamente ativo” ou “funcional” (tal como um polipeptídeo heterólogo) é aquele capaz de exercer uma ou mais de suas atividades naturais em eventos estruturais, regulatórios, bioquímicos ou biofísicos.

[134] Um anticorpo “biologicamente ativo” ou “funcional” é aquele capaz de exercer uma ou mais de suas atividades naturais em eventos estruturais, regulatórios, bioquímicos ou biofísicos. Por exemplo, um anticorpo biologicamente ativo pode ter a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno e a ligação pode por sua vez induzir ou alterar um evento celular ou molecular, tal como a transdução da sinalização ou atividade enzimática. Um anticorpo biologicamente ativo também pode bloquear a ativação do ligante de um receptor ou atuar como um anticorpo agonista. A capacidade de um anticorpo exercer uma ou mais de suas atividades naturais depende de vários fatores, incluindo o enovelamento adequado e montagem das cadeias polipeptídicas. Tal como utilizado no presente, o anticorpo biologicamente ativo gerado pelos métodos divulgados compreende tipicamente de heterotetrâmeros que possuem duas cadeias L idênticas e duas cadeias H idênticas que estão ligadas por múltiplas ligações de bissulfeto e enoveladas corretamente.

COMPOSIÇÕES DA INVENÇÃO E MÉTODOS DE USO DAS MESMAS

[135] Em um aspecto, a presente invenção fornece TIRs variantes. Portanto, para uma dada TIR, pode ser criada uma série de

aminoácidos ou sequência de ácidos nucleicos variantes com uma variedade de forças de tradução, fornecendo assim um meio conveniente pelo qual é possível ajustar este fator para uma secreção ótima de muitos polipeptídeos diferentes. A utilização de um gene repórter expresso sob o controlo destas variantes, tal como phoA, fornece um método para quantificar as forças traducionais relativas de diferentes regiões de iniciação da tradução. As TIRs variantes ou mutantes podem ser fornecidas no fundo de um vetor plasmidial fornecendo assim um conjunto de plasmídeos nos quais um gene de interesse pode ser inserido e ter sua expressão mensurada, de modo a estabelecer uma faixa ótima de forças de tradução para a máxima expressão do polipeptídeo maduro.

[136] A mutagênese da TIR é feita por meio de técnicas convencionais, que resultam na alteração de códons que pode alterar a sequência de aminoácidos, embora sejam preferidas alterações silenciosas na sequência de nucleotídeos. As alterações na TIR podem incluir, por exemplo, alterações no número ou espaçamento de sequências Shine-Dalgarno, juntamente com alterações na sequência sinal. Um método para a geração de sequências sinal mutantes é a geração de um "banco de códon", no início de uma sequência de codificação que não altera a sequência de aminoácidos da sequência sinal (ou seja, as alterações são silenciosas). Isto pode ser obtido pela alteração da terceira posição de nucleotídeo de cada códon; adicionalmente alguns aminoácidos, tal como a leucina, serina e arginina, têm múltiplas primeira e segunda posições que podem aumentar a complexidade ao se fazer o banco. Este método de Mutagênese é descrito em detalhe em Yansura *et al.* (*METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158 (1992)). Basicamente, um fragmento de DNA que codifica a sequência sinal e o início do polipeptídeo maduro é sintetizado de modo que a terceira (e, possivelmente, a primeira e segunda, conforme descrito acima) posição de

cada um dos 6 a 12 primeiros códons é alterada. Os nucleotídeos adicionais a jusante destes códons fornecem um sítio para a ligação de um *primer* complementar utilizado na confecção da fita inferior. O tratamento da fita codificante de cima e da fita do *primer* de baixo com a DNA polimerase I (Klenow) irá resultar em um conjunto de fragmentos de DNA duplexo contendo códons randomizados. Os iniciadores são desenhados para conter locais de clonagem úteis que podem então ser usados para inserir fragmentos de DNA em um vetor adequado, permitindo assim a amplificação do banco de códon. Os métodos alternativos incluem, por exemplo, a substituição do rbs inteiro com nucleotídeos aleatórios (Wilson *et al.*, *BioTechniques* 17 :944-952 (1994)), e a utilização de bibliotecas de exibição por fagos (vide, por exemplo, Barbas *et al.*, *Proc . Natl. Acad. Sci. USA* 89 :4457-4461 (1992); Garrard *et al*, *Gene* 128 :103-109 (1993)).

[137] A translocase Sec bacteriana facilita a exportação de proteínas em procariotos. As proteínas secretoras podem ser direcionadas para o translocase Sec por dois mecanismos diferentes, ou seja, o direcionamento co-traducional e pós-traducional. Neste último caso, a sequência sinal contendo a proteína secretora é liberada do ribossomo no seu estado de síntese completa e é direcionada para a Sec-translocase. Em várias bactérias Gram-negativas, as proteínas secretoras são guiadas para a Sec-translocase pela chaperona específica de secreção SecB, que mantém estas proteínas em um estado não enovelado translocação-competente. Durante o direcionamento por co-tradução, a partícula de reconhecimento de sinal (SRP) liga-se à sequência sinal da proteína secretora ao mesmo tempo em que ela emerge do ribossomo e o complexo ternário inteiro ‘SRP/ribossomo/cadeia da proteína secretora nascente’ é direcionado para a Sec-translocase.

[138] Por exemplo, os peptídeos sinal da proteína periplasmática de ligação a maltose (MalE) e fosfatase alcalina (PhoA) direcionam a

translocação do citoplasma para o periplasma de maneira pós-traducional com o auxílio do motor molecular SecA. Outros peptídeos sinal exemplares que direcionam a translocação de maneira pós-traducional são dsbC, lola, ompA, lamB, e lpp. Os peptídeos sinal da enterotoxina II estável ao calor (stII) e proteína de intercâmbio tiol:bissulfeto (dsbA) direcionam a translocação de maneira co-traducional com a ajuda da partícula de reconhecimento de sinal (SRP). Outros peptídeos sinal exemplares que direcionam a translocação de maneira co-traducional são yral, tort, tolB, sfmC, nikA, e sfmC. Vide também Natale *et al* para uma revisão da secreção de proteína através da membrana citoplasmática bacteriana mediada por Sec- e Tat-. (Natale *et al.* (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:1735-56.)

[139] Nós desenvolvemos novas bibliotecas de peptídeo sinal da região de iniciação da tradução (TIR) variante (Figura 2, Tabela 2) para peptídeos sinal que representam duas das principais vias de secreção para o transporte através da membrana interna na *E. coli*: sec (PhoA, MalE) e SRP (DsbA, STII). Cada biblioteca compreende um painel de vetores compreendendo TIRs variantes de diferentes forças traducionais, fornecendo meios para o fácil ajuste do nível de tradução para uma dada proteína de interesse.

[140] Normalmente, as TIRs variantes serão fornecidas em um vetor plasmidial com elementos adequados para a expressão de um gene de interesse. Por exemplo, uma construção típica irá conter um promotor 5' para a sequência sinal, um sítio de reconhecimento da enzima de restrição a 3' da sequência sinal para a inserção de um gene de interesse ou um gene repórter, e um marcador selecionável, tal como um marcador de resistência a drogas, para a seleção e/ou manutenção das bactérias transformadas com os plasmídeos resultantes. Os vetores plasmidiais são discutidos e exemplificados no presente. Os promotores adequados para utilização com hospedeiros

procarióticos são conhecidos no estado da técnica e alguns são exemplificados e descritos no presente.

[141] Pode ser utilizado qualquer gene repórter que possa ser quantificado de alguma forma. Portanto, por exemplo, a produção da fosfatase alcalina pode ser quantificada como uma medida do nível secretado do produto do gene *phoA*. Outros exemplos incluem, por exemplo, os genes da β -lactamase.

[142] Geralmente, pode ser gerado um conjunto de vetores com TIR de várias forças para cada *cistron* contido no vetor. Este conjunto limitado fornece uma comparação dos níveis de expressão de cada cadeia, bem como o rendimento dos produtos de comprimento total sob as diversas combinações de forças da TIR. As forças da TIR podem ser determinadas pela quantificação do nível de expressão de um gene repórter, conforme descrito detalhadamente em Simmons *et al.* Patente US 5.840.523. Para os propósitos da presente invenção, a combinação da força traducional de um determinado par de TIRs dentro de um vetor é representada por (N-leve, M-pesado), em que N é a força da TIR relativa da cadeia leve e M é a força da TIR relativa da cadeia pesada. Por exemplo, (3-leve, 7-pesado) significa que o vetor fornece uma força da TIR relativa de cerca de 3 para a expressão da cadeia leve e uma força da TIR relativa de cerca de 7 para a expressão da cadeia pesada. Com base na comparação da força traducional, as TIRs individuais desejadas são selecionadas para serem combinadas nas construções de vetores de expressão da invenção. Os vetores construídos dessa forma podem ser utilizados para transformar um hospedeiro adequado. Preferencialmente, o hospedeiro é um hospedeiro procariótico. Mais preferencialmente, o hospedeiro é *E. coli*.

[143] O nível de polipeptídeos secretado pode ser determinado, por exemplo, por um ensaio funcional para o polipeptídeo de interesse, se

disponível, radioimunoensaios (RIA), ensaio imunoenzimático (ELISA), ou por PAGE e visualização do peso molecular correto do polipeptídeo de interesse. Os métodos para determinar o nível de polipeptídeo secretado são bem conhecidos no estado da técnica e alguns estão exemplificados na presente invenção.

ANTICORPOS

[144] Os anticorpos da invenção são preferencialmente monoclonais. Estão também dentro do escopo da presente invenção os fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH e F(ab')₂ dos anticorpos fornecidos no presente. Estes fragmentos de anticorpos podem ser gerados por meios tradicionais, tal como por digestão enzimática, ou podem ser gerados por técnicas recombinantes. Tais fragmentos de anticorpos podem ser quiméricos ou humanizados. Esses fragmentos são úteis para os fins diagnósticos e terapêuticos definidos abaixo.

[145] Consequentemente, em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-c-met é um anticorpo de braço único (ou seja, o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve formam um único braço de ligação com antígeno) compreendendo uma região Fc, em que a região Fc compreende um primeiro e um segundo polipeptídeo Fc, onde o primeiro e segundo polipeptídeo Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc, que aumenta a estabilidade do referido fragmento de anticorpo quando comparado com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao antígeno. Para o tratamento de condições patológicas que requerem uma função antagonística, e quando a bivalência de um anticorpo resulta em um efeito agonístico indesejável, a característica monovalente de um anticorpo de braço único (ou seja, um anticorpo que compreende um único braço de ligação ao antígeno) resulta em e/ou assegura uma função antagonista após ligação do anticorpo a uma molécula alvo. Além disso, o anticorpo de braço

único que comprehende uma região Fc é caracterizado por atributos farmacocinéticos superiores (tal como uma meia-vida melhorada e/ou menor taxa de depuração *in vivo*) em comparação com as formas Fab possuindo características de ligação aos抗ígenos similares/substancialmente idênticas, superando assim um grande inconveniente na utilização de anticorpos Fab monovalentes convencionais. Os anticorpos de braço único são divulgados, por exemplo, no documento WO2005/063816; Martens *et al*, *Clin Cancer Res*. (2006), 12: 6144. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo de braço único é um fragmento de anticorpo monovalente, em que o fragmento de anticorpo comprehende um primeiro polipeptídeo comprehendendo um domínio variável de cadeia leve, um segundo polipeptídeo comprehendendo um domínio variável de cadeia pesada e o dito primeiro polipeptídeo Fc, e um terceiro polipeptídeo Fc comprehendendo o segundo polipeptídeo Fc, em que o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve formam o braço único de ligação ao抗ígeno, e o primeiro e segundo polipeptídeo Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc que aumenta a estabilidade do referido fragmento de anticorpo em comparação a uma molécula Fab que comprehende o dito braço de ligação ao抗ígeno.

[146] Em alguns exemplos de realização, o anticorpo se liga (em alguns exemplos de realização, se liga especificamente) a c-met. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-c-met comprehende (a) um primeiro polipeptídeo comprehendendo um domínio variável de cadeia pesada possuindo a sequência:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMI
DPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVT
PLDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:43), sequência CH1, e um primeiro polipeptídeo Fc, (b) um segundo polipeptídeo comprehendendo o domínio variável de cadeia leve possuindo a sequência:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLL
IYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFG
QGTKVEIKR (SEQ ID NO:44), e sequência CL1, e (c) um terceiro polipeptídeo
compreendendo um segundo polipeptídeo Fc, em que o domínio variável de
cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve estão presentes como um
complexo e formam um único braço de ligação ao antígeno, em que o primeiro
e segundo polipeptídeo Fc estão presentes em um complexo e formam uma
região Fc que aumenta a estabilidade do dito fragmento de anticorpo em
comparação com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao
antígeno. Em algumas realizações, o primeiro polipeptídeo compreende a
sequência Fc exibida na Figura 7 (SEQ ID NO: 68) e o segundo polipeptídeo
compreende a sequência Fc exibida na Figura 8 (SEQ ID NO: 47). Em algumas
realizações, o primeiro polipeptídeo compreende a sequência Fc exibida na
Figura 8 (SEQ ID NO: 47) e o segundo polipeptídeo compreende a sequência
Fc exibida na Figura 7 (SEQ ID NO: 68).

[147] Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-c-met
compreende (a) um primeiro polipeptídeo compreendendo um domínio variável
de cadeia pesada, em que o dito polipeptídeo compreende a sequência:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMI
DPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVT
PLDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 45); (b) um
segundo polipeptídeo compreendendo um domínio variável de cadeia leve, em

que o dito polipeptídeo compreende a sequência: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKSSQSLLYTSSQKNYLA WYQQKPGKAPKLL IYWASTRESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYSLSSLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:46); e um terceiro polipeptídeo compreendendo uma sequência Fc, em que o polipeptídeo compreende a sequência: DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTI SKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47); em que o domínio variável da cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve estão presentes como um complexo e formam um único braço de ligação ao antígeno, em que o primeiro e segundo polipeptídeos Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc que aumenta a estabilidade do referido fragmento de anticorpo em comparação com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao antígeno.

[148] Em um aspecto, o anticorpo anti-c-met compreende:

(a) pelo menos um, dois, três, quatro ou cinco sequências de regiões hipervariáveis (CDR) selecionadas a partir do grupo consistindo em:

(i) CDR-L1 compreendendo a sequência A1-A17, em que A1-A17 é KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 49);

(ii) CDR-L2 compreendendo a sequência B1-B7, em que B1-B7 é WASTRES (SEQ ID NO: 50);

(iii) CDR-L3 compreendendo a sequência C1-C9, em que C1-C9 é QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 51);

(iv) CDR-H1 compreendendo a sequência D1-D10, em que D1-

D10 é GYTFTSYWLH (SEQ ID NO: 52);

(v) CDR-H2 compreendendo a sequência E1-E18, em que E1-E18 é GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO: 53); e

(vi) CDR-H3 compreendendo a sequência F1-F11, em que F1-F11 é T/SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 54);

e; (b) pelo menos um CDR variante, em que a sequência CDR variante compreende a modificação de pelo menos um resíduo da sequência representada em (i) - (vi). Em um exemplo de realização, o CDR-H3 compreende TYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 55). Em um exemplo de realização, o CDR-H3 compreende SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 56). Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreendendo estas sequências (em combinação, conforme descrito no presente) é humanizado ou humano.

[149] Em uma realização, o anticorpo anti-c-met compreende um domínio variável de cadeia pesada compreendendo uma ou mais das sequências CDR1-HC, CDR2-HC e CDR3-HC exibidas na Figura 7 (: 52-53 & 66). Em algumas realizações, o anticorpo compreende um domínio variável de cadeia leve compreendendo uma ou mais sequências CDR1-LC, CDR2-LC e CDR3-LC exibidas na Figura 7 (SEQ ID NOs: 49-51). Em algumas realizações, o domínio variável de cadeia pesada compreende a sequência FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC e HC-FR4 exibida na Figura 7 (SEQ ID NOs: 62-65). Em algumas realizações, o domínio variável de cadeia leve compreende a sequência FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC e FR4-LC exibida na Figura 7 (SEQ ID NOs: 57-60).

[150] As HVRs variantes em um anticorpo anti-c-met da invenção podem ter modificações de um ou mais resíduos dentro da HVR. Em alguns exemplos de realização, uma HVR-L2 variante compreende 1-5 (1, 2, 3, 4 ou 5) substituições em qualquer combinação das seguintes posições: B1 (M ou L), B2 (P, T, G ou S), B3 (N, G, R ou T), B4 (I, N ou F), B5 (P, I, L ou G), B6 (A, D, T ou V) e B7 (R, I, M ou G). Em alguns exemplos de realização, uma HVR-H1

variante compreende 1-5 (1, 2, 3, 4 ou 5) substituições em qualquer combinação das seguintes posições: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S ou Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T ou V) e D9 (M ou V). Em alguns exemplos de realização, uma HVR-H2 variante compreende 1-4 (1, 2, 3 ou 4) substituições em qualquer combinação das seguintes posições: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T ou Q), E15 (D, K, S, T ou V), E16 (L), E17 (E, H, N ou D) e E18 (Y, E ou H). Em alguns exemplos de realização, uma HVR-H3 variante compreende 1-5 (1, 2, 3, 4 ou 5) substituições em qualquer combinação das seguintes posições: F1 (T, S), F3 (R, S, H, T, A, K), F4 (G), F6 (R, F, M, T, E, K, A, L, W), F7 (L, I, T, R, K, V), F8 (S, A), F10 (Y, N) e F11 (Q, S, H, F). A(s) letra(s) entre parênteses após cada posição indica uma substituição ilustrativa (isto é, uma reposição) de aminoácido; como seria evidente para um técnico do assunto, a adequação de outros aminoácidos como aminoácidos de substituição no contexto descrito na presente invenção pode ser avaliada rotineiramente utilizando técnicas conhecidas na arte e/ou descritas na presente invenção. Em um exemplo de realização, uma HVR-L1 compreende a sequência SEQ ID NO: 49. Em um exemplo de realização, F1 em uma HVR-H3 variante é T. Em um exemplo de realização, F1 em uma HVR-H3 variante é S. Em um exemplo de realização, F3 em uma HVR-H3 variante é R. Em um exemplo de realização, F3 em uma HVR-H3 variante é S. Em um exemplo de realização, F7 em uma HVR-H3 variante é T. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-H3 variante em que F1 é T ou S, F3 é R ou S, e F7 é T.

[151] Em um exemplo de realização, um anticorpo anti-c-met da invenção compreende uma HVR-H3 variante, em que F1 é T, F3 é R, e F7 é T. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-H3 variante, em que F1 é S. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-H3 variante, em que F1 é T e F3 é R. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-

H3 variante, em que F1 é S, F3 é R e F7 é T. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-H3 variante, em que F1 é T, F3 é S, F7 é T e F8 é S. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-H3 variante, em que F1 é T, F3 é S, F7 é T e F8 é A. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo HVR-H3 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 e HVR-H2 em que cada um compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52 e 53. Em um exemplo de realização, estes anticorpos compreendem ainda a sequência de consenso da região estrutural da cadeia pesada subgrupo III humano. Em um exemplo de realização destes anticorpos, a sequência consenso da região estrutural compreende uma substituição na posição 71, 73, e/ou 78. Em alguns exemplos de realizações destes anticorpos, a posição 71 é A, 73 é T e/ou 78 é A. Em um exemplo de realização destes anticorpos, os ditos anticorpos compreendem ainda da sequência de consenso da região estrutural da cadeia leve κI humana.

[152] Em um exemplo de realização, um anticorpo anti-c-met da invenção compreende uma HVR-L2 variante, em que B6 é V. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo com HVR-L2 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3, em que cada uma compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 51, 52, 53, 54. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo com HVR-L2 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3, em que cada uma compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 51, 52, 53, 55. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo com a HVR-L2 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3, em que cada uma compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 51, 52, 53, 56. Em um exemplo de realização, estes anticorpos compreendem

ainda a sequência de consenso da região estrutural da cadeia pesada subgrupo III humano. Em um exemplo de realização destes anticorpos, a sequência consenso da região estrutural compreende uma substituição na posição 71, 73, e/ou 78. Em alguns exemplos de realizações destes anticorpos, a posição 71 é A, 73 é T e/ou 78 é A. Em um exemplo de realização destes anticorpos, os ditos anticorpos compreendem ainda a sequência de consenso da região estrutural da cadeia leve κI humana.

[153] Em um exemplo de realização, um anticorpo anti-c-met da invenção compreende uma HVR-H2 variante, em que E14 é T, E15 é K, e E17 é E. Em um exemplo de realização, um anticorpo da invenção compreende uma HVR-H2 variante, em que E17 é E. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo com a HVR-H3 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 e HVR-H3 em que cada uma compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 54. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo com HVR-H2 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 e HVR-H3, em que cada uma compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 55. Em alguns exemplos de realização, o dito anticorpo com HVR-H2 variante compreende adicionalmente a HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 e HVR-H3, em que cada uma compreende, respectivamente, a sequência descrita nas SEQ ID NOs: 49, 50, 51, 52, 55. Em um exemplo de realização, estes anticorpos compreendem ainda a sequência de consenso da região estrutural da cadeia pesada subgrupo III humano. Em um exemplo de realização destes anticorpos, a sequência consenso da região estrutural compreende uma substituição na posição 71, 73, e/ou 78. Em alguns exemplos de realizações destes anticorpos, a posição 71 é A, 73 é T e/ou 78 é A. Em um exemplo de realização destes anticorpos, os ditos anticorpos compreendem ainda da sequência de consenso da região estrutural da cadeia

leve a humana.

[154] Outros anticorpos anti-c-met adequados para a utilização nos métodos da invenção são conhecidos no estado da técnica.

[155] Em um aspecto, o anticorpo anti-c-met compreende pelo menos uma característica que promove heterodimerização, minimizando a homodimerização, das sequências Fc no fragmento de anticorpo. Essa(s) característica(s) melhora(m) a produtividade e/ou grau de pureza e/ou homogeneidade das populações de imunoglobulinas. Em uma realização, o anticorpo compreende mutações em Fc constituindo "knobs" e "holes" conforme descrito no documento WO2005/063816. Por exemplo, uma mutação "hole" pode ser um ou mais dentre T366A, L368A e/ou Y407V em um polipeptídeo Fc, e uma mutação "knob" pode ser T366W. As mutações "Knob" e "Hole" de Fc são adicionalmente descritas no presente documento.

[156] Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, ou seja, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. Assim, o adjetivo "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo obtido a partir de uma mistura de anticorpos distintos.

[157] Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser fabricados utilizando o método do hibridoma descrito primeiramente por Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975) ou podem ser produzidos por meio de métodos de DNA recombinante (Patente US 4.816.567).

[158] No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro adequado, tal como o hamster, é imunizado para suscitar os linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam de forma específica a proteína utilizada para imunização. Os anticorpos são

criados em animais por meio de múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) de antígeno e um adjuvante. O antígeno pode ser preparado usando métodos conhecidos no estado da técnica, alguns dos quais estão descritos no presente. Por exemplo, a produção recombinante de antígeno humano e de camundongo está descrita abaixo. Em um exemplo de realização, os animais são imunizados com um antígeno fundido a uma porção Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Em um exemplo de realização preferido, os animais são imunizados com uma proteína de fusão 'antígeno-IgG1'. Os animais normalmente são imunizados contra conjugados imunogênicos ou derivados de antígeno com monofosforil lipídio A (MPL)/dicerinomicolato de trealose (TDM) (Ribi Immunochem. Inc., Hamilton, MT) e a solução é injetada por via intradérmica em múltiplos locais. Duas semanas depois, os animais são submetidos a imunizações intensificadoras (*boosted*). De 7 a 14 dias mais tarde os animais são sangrados e o soro é avaliado quanto ao título de anticorpo. Os animais são submetidos a imunizações intensificadoras até atingir o título platô.

[159] Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são fundidos em seguida com células de mieloma, utilizando um agente de fusão apropriado, tal como o polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59 a 103 (Academic Press, 1986)).

[160] As células de hibridoma assim preparadas podem ser semeadas e cultivadas em um meio de cultura apropriado que contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não possuem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o

crescimento de células com deficiência em HGPRT.

[161] Células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a produção estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio, tal como meio HAT. Entre estas, as linhagens de células de mieloma mais preferidas são linhagens de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 que podem ser obtidas no *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis pela *American Type Culture Collection*, Rockville, Maryland USA. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano/camundongo também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

[162] O meio de cultura em que são cultivadas células de hibridoma é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada pela imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tais como o radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoenzimático (ELISA).

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

[164] Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitantes e cultivados por meio de métodos-padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs.59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura apropriados

para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores ascíticos em um animal.

[165] Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são apropriadamente separados do meio de cultura, líquido ascítico ou soro por meio de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

[166] Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos utilizando bibliotecas combinatórias para a procura de clones de anticorpos sintéticos com a(s) atividade(s) desejada(s). Em princípio, os clones sintéticos de anticorpos são selecionados pela triagem de bibliotecas de fago contendo fagos que exibem vários fragmentos da região variável de anticorpos (Fv) fundidos na proteína da cápside do fago. Essas bibliotecas de fago são testadas por cromatografia de afinidade contra o antígeno desejado. Clones expressando fragmentos Fv capazes de se ligar ao antígeno desejado são adsorvidos pelo antígeno e, assim, separados dos clones que não se ligam na biblioteca. Os clones que se ligaram são então eluídos do antígeno e podem ainda ser enriquecidos por ciclos adicionais de adsorção/eluição de antígenos. Qualquer um dos anticorpos da presente invenção pode ser obtido pela concepção de um procedimento de seleção adequado para selecionar o clone fago de interesse seguido pela construção de um clone de anticorpo usando as sequências Fv a partir do clone fago de interesse e a sequência adequada da região constante (FC) descrita em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Um método exemplar para a geração de anticorpos é divulgada na seção Exemplos.

[167] O domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo é

formado por duas regiões variáveis (V) de cerca de 110 aminoácidos, selecionados, cada um, de cadeias leve (VL) e pesada (VH), em que ambos apresentam três alças hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Os domínios variáveis podem ser exibidos funcionalmente no fago, tanto como fragmentos Fv de cadeia simples (scFv), em que VH e VL são covalentemente ligados por meio de um peptídeo flexível e curto, quanto como fragmentos Fab, em que são, cada um, fundidos a um domínio constante, e interagem de forma não covalente, conforme descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Conforme utilizado na presente invenção, os clones fagos que codificam scFv e clones fagos que codificam Fab são coletivamente referenciados como “clones de fagos Fv” ou “clones Fv”.

[168] Os repertórios de genes VH e VL podem ser clonados separadamente por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e recombinados de forma aleatória em bibliotecas de fagos, que podem então ser pesquisados para os clones de ligação ao antígeno, conforme descrito em Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Bibliotecas de fontes imunizadas fornecem anticorpos de alta afinidade para o imunógeno, sem a necessidade de construção de hibridomas. Alternativamente, o repertório inicial (*naive*) pode ser clonado para fornecer uma única fonte de anticorpos humanos para uma ampla variedade de抗ígenos não próprios (*non-self*) e também próprios (*self*), sem qualquer imunização, conforme descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, bibliotecas iniciais (*naive*) podem também ser produzidas sinteticamente por meio de clonagem de segmentos de gene V não rearranjados a partir de células tronco, e utilizando *primers* de PCR que contém sequência aleatória para codificar as regiões CDR3 altamente variáveis e para realizar o rearranjo *in vitro*, conforme descrito por Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

[169] Fagos filamentosos são utilizados para exibir fragmentos de anticorpo pela fusão com a proteína de revestimento menor pIII. Os fragmentos de anticorpos podem ser exibidos como fragmentos Fv de cadeia simples, em que os domínios VH e VL são conectados na mesma cadeia polipeptídica por um espaçador de polipeptídeo flexível, tal como descrito por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou como fragmentos Fab, em que uma cadeia é fundida a pIII e a outra é secretada no periplasma de células hospedeiras bacterianas, onde ocorre a montagem de uma estrutura proteína de revestimento-Fab que passa a ser exibida na superfície do fago pelo deslocamento de algumas das proteínas tipo selvagem do revestimento, conforme descrito em Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

[170] Em geral, ácidos nucleicos que codificam fragmento gênico do anticorpo são obtidos a partir de células imunes coletadas de humanos e animais. Se uma biblioteca influenciada a favor de clones direcionados a um antígeno específico é desejada, o indivíduo é imunizado com o antígeno para gerar uma resposta de anticorpos e as células do baço e/ou células B circulantes ou outros linfócitos do sangue periférico (PBLs) são recuperados para a construção da biblioteca. Em uma realização, uma biblioteca de fragmento de gene de anticorpo humano influenciada a favor de clones reativos ao antígeno é obtida pela geração de respostas de anticorpos em camundongos transgênicos que carregam um arranjo gênico de imunoglobulina humana funcional (e carecem de um sistema de produção de anticorpo endógeno funcional), de modo que a imunização ao antígeno eleva a produção de anticorpos humanos contra o antígeno pelas células B. A geração de camundongos transgênicos que produzem anticorpos humanos é descrita abaixo.

[171] O enriquecimento adicional para populações de células

reativas ao antígeno pode ser obtida pelo uso de um procedimento de seleção apropriado para isolar células B que expressam o anticorpo ligado a membrana específico para o antígeno, por exemplo, pela separação de células com a cromatografia por afinidade do antígeno ou a adsorção de células ao antígeno marcado com fluorocromo seguido pela seleção das células ativadas por fluorescência (FACS).

[172] Alternativamente, o uso de células do baço e/ou células B ou outras PBLs de um doador não imunizado fornece uma melhor representação do possível repertório de anticorpo, e também permite a construção de uma biblioteca de anticorpos utilizando qualquer espécie animal (humana ou não humana) no qual o antígeno não é antigênico. Para bibliotecas que incorporam construção gênica de anticorpo *in vitro*, as células-tronco são coletadas do indivíduo para fornecer ácidos nucleicos que codificam segmentos gênicos de anticorpo não rearranjados. As células imunes de interesse podem ser obtidas de uma série de espécies animais, tal como humano, camundongo, rato, lagomorfos, lúprinos, caninos, felinos, porcos, bovinos, equinos e espécies de aves etc.

[173] Ácidos nucleicos que codificam segmentos gênicos variáveis de anticorpos (incluindo segmentos VH e VL) são recuperados de células de interesse e amplificados. No caso de bibliotecas gênicas VH e VL rearranjadas, o DNA desejado pode ser obtido pelo isolamento de DNA genômico ou mRNA de linfócitos, seguido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers que reconhecem as extremidades 5' e 3' de genes VH e VL rearranjados , conforme descrito em Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), produzindo, desta forma, repertórios diversos de gene V para expressão. Os genes V podem ser amplificados de cDNA e DNA genômico, com *primers* reversos na extremidade 5' do exon que codifica o domínio V maduro, e *primers* diretos com base no segmento J, conforme descrito em

Orlandi *et al.* (1989) e em Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Entretanto, para a amplificação de cDNA, *primers* reversos podem também ser baseados no exon líder, conforme descrito por Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), e *primers* diretos na região constante, conforme descrito em Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar a complementaridade, degeneração pode ser incorporada nos *primers*, conforme descrito em Orlandi *et al.* (1989) ou Sastry *et al.* (1989). Preferivelmente, a diversidade da biblioteca é maximizada pelo uso de *primers* de PCR alvos para cada família de gene V, para amplificar todos os arranjos VH e VL disponíveis presentes na amostra de ácido nucleico de células imunes, por exemplo, conforme descrito no método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou conforme descrito no método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para a clonagem do DNA amplificado em vetores de expressão, sítios de restrição raros podem ser introduzidos no *primer* de PCR como uma marca em uma extremidade, conforme descrito em Orlandi *et al.* (1989), ou pela amplificação por PCR adicional com um primer marcado, conforme descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

[174] Os repertórios de genes V rearranjados sinteticamente podem ser derivados *in vitro* de segmentos de gene V. A maior parte dos segmentos de gene VH humanos pode ser clonada e sequenciada (descrito em Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), e mapeada (descrito em Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estes segmentos clonados (incluindo todas as conformações principais da alça H1 e H2) podem ser utilizados para gerar diversos repertórios de gene VH com *primers* de PCR que codificam alças H3 de diversas sequências e comprimentos, conforme descrito em Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Repertórios de VH podem também ser produzidos com toda a diversidade de sequência, focada em uma alça (*loop*) H3 longa de um único comprimento, conforme

descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 4457-4461 (1992). Segmentos $V\kappa$ e $V\lambda$ humanos foram clonados e sequenciados (descrito em Williams e Winter, *Eur. J. Immunol.*, **23**: 1456-1461 (1993)) e podem ser utilizados para produzir repertórios de cadeia leve sintéticos. Os repertórios de gene V sintéticos, com base em uma gama de enovelamentos de VH e VL, e comprimentos L3 e H3, codificarão anticorpos de considerável diversidade estrutural. Seguindo a amplificação dos DNAs que codificam o gene V, segmentos de gene V de linhagem germinativa podem ser rearranjados *in vitro* de acordo com métodos de Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**: 381-388 (1992).

[175] Os repertórios de fragmentos de anticorpo podem ser construídos pela combinação de repertórios dos gene VH e VL juntos em diversas formas. Cada repertório pode ser criado em diferentes vetores, e os vetores recombinados *in vitro*, por exemplo, conforme descrito em Hogrefe *et al.*, *Gene*, **128**: 119-126 (1993), ou *in vivo* por infecção combinatória, por exemplo, o sistema loxP descrito em Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **21**: 2265-2266 (1993). O método de recombinação *in vivo* explora a natureza de cadeia dupla de fragmentos Fab para superar o limite de tamanho da biblioteca imposto pela eficiência de transformação em *E. coli*. Repertórios VH e VL iniciais (*naive*) são clonados de forma separada, um em um fagomídeo e o outro em um vetor de fago. As duas bibliotecas são então combinadas pela infecção por fago da bactéria contendo fagomídeo, de forma que cada célula contém uma combinação diferente, e o tamanho da biblioteca é limitado apenas pelo número de células presente (cerca de 10^{12} clones). Ambos os vetores contêm sinais de recombinação *in vivo*, de forma que os genes VH e VL sejam recombinados em um único replicon, e são co-embalados em vírion de fago. Estas diversas bibliotecas fornecem um grande número de anticorpos diversos de boa afinidade (K_d^{-1} de cerca de 10^{-8} M).

[176] Alternativamente, os repertórios podem ser clonados de forma sequencial no mesmo vetor, tal como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 7978-7982 (1991), ou unidos por PCR e então clonados, conforme descrito em Clackson *et al.*, *Nature*, **352**: 624-628 (1991). A junção por PCR pode também ser utilizada para unir DNAs VH e VL com DNA que codifica um espaçador peptídico flexível para formar repertórios de Fv de cadeia simples (scFv). Ainda em outra técnica, a “montagem por PCR em célula” (*in cell PCR assembly*) é utilizada para combinar genes VH e VL nos linfócitos por PCR e então os repertórios dos genes ligados são clonados, conforme descrito em Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **20**: 3831-3837 (1992).

[177] Os anticorpos produzidos por bibliotecas iniciais (*naive*) (tanto naturais quanto sintéticos) podem ser de afinidade moderada (K_d^{-1} de cerca de 10^6 a 10^7 M $^{-1}$), mas maturação por afinidade também pode ser mimetizada *in vitro* pela construção e nova seleção de bibliotecas secundárias, conforme descrito em Winter *et al.* (1994), *supra*. Por exemplo, mutações podem ser introduzidas de forma aleatória *in vitro* pelo uso da polimerase passível de erro (descrito em Leung *et al.*, *Technique*, **1**: 11-15 (1989)) no método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **226**: 889-896 (1992) ou no método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **89**: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, a maturação por afinidade pode ser realizada por mutação aleatória de uma ou mais CDRs, por exemplo, pelo uso de PCR com *primers* que carregam sequências aleatórias abrangendo a CDR de interesse, em clones Fv individuais selecionados e triados para alta afinidade. O documento WO 96/07754 (publicado em 14 de março de 1996) descreveu um método para indução da mutagênese em uma região determinante de complementaridade de uma cadeia leve de imunoglobulina para criar uma biblioteca de genes de cadeia leve. Outra realização eficaz é recombinar os domínios VH ou VL selecionados pela exibição por fago com repertórios de variantes do domínio V

de ocorrência natural, obtidos a partir de doadores não imunizados, e seleção para alta afinidade em diversos ciclos de reorganização da cadeia, conforme descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, **10**: 779-783 (1992). Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpos com afinidades na faixa de 10^{-9} M.

[178] A sequência de ácido nucleico que codifica o antígeno alvo desejado pode ser projetada usando a sequência de aminoácidos da região desejada do antígeno.

[179] Os ácidos nucleicos codificantes do antígeno alvo podem ser preparados por uma variedade de métodos conhecidos no estado da técnica. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, síntese química por qualquer um dos métodos descritos em Engels *et al.* *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**: 716-734 (1989), tal como os métodos de triéster, fosfito, fosforamidita e H-fosfonato. Em um exemplo de realização, os códons preferidos pela célula hospedeira de expressão são utilizados no desenvolvimento do DNA que codifica o antígeno. Alternativamente, o DNA codificante do antígeno pode ser isolado a partir de uma biblioteca genômica ou de cDNA.

[180] Após a construção da molécula de DNA que codifica o antígeno, a molécula de DNA é operacionalmente ligada a uma sequência de controle de expressão em um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, de modo que a sequência de controle é reconhecida pela célula hospedeira transformada com o vetor. De modo geral, os vetores plasmídeos possuem sequências de replicação e controle que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. Normalmente o vetor carrega um sítio de replicação, bem como sequências que codificam proteínas que são capazes de fornecer a seleção fenotípica nas células transformadas. Os vetores adequados para a expressão nas células hospedeiras procariotas e eucariotas são conhecidos no estado da técnica e alguns estão descritos em maiores detalhes

na presente invenção. Podem ser utilizados organismos eucarióticos, tal como leveduras, ou células derivadas de organismos multicelulares, tal como os mamíferos.

[181] Opcionalmente, o DNA que codifica o antígeno está operacionalmente ligado a uma sequência “líder de secreção” resultando na secreção do produto de expressão a partir da célula hospedeira para o meio de cultura. Exemplos de sequências líder de secreção incluem *stl*, *ecotin*, *IamB*, *herpes GD*, *Ipp*, fosfatase alcalina, invertase e fator alfa. É também adequado para utilização na presente invenção a sequência líder aminoácido 36 da proteína A (Abrahmsen *et al*, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

[182] As células hospedeiras são transfectadas e preferivelmente transformadas com os vetores de expressão ou de clonagem descritos acima na presente invenção e cultivadas em meio nutriente convencional modificado de forma a ser apropriado para a indução dos promotores, seleção de transformantes ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas.

[183] Transfecção refere-se a incorporação de um vetor de expressão por uma célula hospedeira, independentemente se as sequências deste vetor são ou não de fato expressas. Diversos métodos de transfecção são conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto, por exemplo, a precipitação em CaPO_4 e eletroporação. Uma transfecção realizada com sucesso é geralmente reconhecida quando qualquer indicação da operação do vetor transfectado ocorre dentro da célula hospedeira. Os métodos de transfecção são bem conhecidos no estado da técnica, e alguns são adicionalmente descritos na presente invenção.

[184] Transformação significa a introdução de DNA em um organismo de forma que o DNA seja replicável, quer seja como um elemento extracromossômicos ou como um integrante cromossômico. Dependendo da

célula hospedeira utilizada, a transformação é feita utilizando técnicas padrões apropriada para tais células. Os métodos de transformação são bem conhecidos no estado da técnica, e alguns são adicionalmente descritos na presente invenção.

[185] As células hospedeiras procarióticas usadas para produzir o antígeno podem ser cultivadas conforme descrito de modo geral em Sambrook *et al. Supra.*

[186] As células hospedeiras de mamíferos usadas para produzir o antígeno podem ser cultivadas em uma variedade de meios, que são bem conhecidos no estado da técnica e alguns deles estão descritos na presente invenção.

[187] As células hospedeiras referidas na presente divulgação abrangem células em cultura *in vitro*, bem como células que estão dentro de um animal hospedeiro.

[188] A purificação do antígeno pode ser realizada utilizando métodos reconhecidos no estado da técnica, alguns dos quais são descritos na presente invenção.

[189] O antígeno purificado pode ser anexado a uma matriz adequada, tais como esferas de agarose, esferas de acrilamida, esferas de vidro, celulose, vários copolímeros acrílicos, gel de metacrilato de hidroxila, copolímeros poliacrílico e polimetacrílico, *nylon*, veículos neutros e iônicos, e similares para uso na separação cromatográfica por afinidade de clones exibidos em fagos. A fixação da proteína antígeno à matriz pode ser realizada por métodos descritos em *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Uma técnica comumente empregada para o acoplamento de proteínas ligantes em matrizes de polissacarídeos, por exemplo, agarose, dextrano ou celulose, envolve a ativação do transportador com haletos de cianogênio e o subsequente acoplamento de aminas aromáticas ou alifáticas primárias do peptídeo ligante à

matriz ativada.

[190] Alternativamente, o antígeno pode ser utilizado para revestir as paredes de placas de adsorção, expresso em células hospedeiras fixadas nas placas de adsorção ou utilizado na seleção de células, ou conjugado com biotina para captura com esferas revestidas com estreptoavidina, ou utilizado em qualquer outro método conhecido no estado da técnica para selecionar bibliotecas de exibição por fago.

[191] As amostras de biblioteca de fago são colocadas em contato com o antígeno imobilizado sob condições adequadas para a ligação de pelo menos uma porção das partículas de fago com o adsorvente. Normalmente, as condições, incluindo pH, força iônica, temperatura e similares, são selecionadas de forma a imitar condições fisiológicas. Os fagos ligados à fase sólida são lavados e então eluídos com ácido, como descrito em Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), ou com álcali, conforme descrito em Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), ou pela competição do antígeno, por exemplo, em um procedimento similar ao método de competição do antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Fagos podem ser enriquecidos de 20-1.000 vezes em um único ciclo de seleção. Adicionalmente, os fagos enriquecidos podem ser crescidos em culturas bacterianas e submetidos a etapas adicionais de seleção.

[192] A eficiência de seleção depende de diversos fatores, incluindo as cinéticas de dissociação durante a lavagem, e se múltiplos fragmentos de anticorpos em um único fago podem se engajar simultaneamente com o antígeno. Anticorpos com rápida dissociação cinética (e fraca afinidade de ligação) podem ser retidos pelo uso de lavagens curtas, exibição por fago multivalente e alta densidade de revestimento de antígeno na fase sólida. A alta densidade não apenas estabiliza o fago por meio de interações multivalente, mas favorece a nova ligação do fago que foi

dissociado. A seleção de anticorpos com cinéticas de dissociação lentas (e boa afinidade de ligação) pode ser promovida pelo uso de longas lavagens e exibição por fago monovalente, conforme descrito em Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) e no documento WO 92/09690, e uma baixa densidade de revestimento de antígeno, conforme descrito em Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

[193] É possível realizar a seleção entre anticorpos de fago de diferentes afinidades, mesmo com afinidades que diferem levemente. Entretanto, mutação aleatória de um anticorpo selecionado (por exemplo, conforme realizado em algumas das técnicas de maturação por afinidade) é suscetível a gerar diversos mutantes, a maioria se ligando ao antígeno, e poucos com alta afinidade. Com a restrição de antígeno, os raros fagos com alta afinidade podem estar fora da competição. Para reter todos os mutantes de alta afinidade, fagos podem ser incubados com excesso de antígeno biotinilado, mas com o antígeno biotinilado em uma concentração de molaridade mais baixa que a constante de afinidade molar alvo para o antígeno. Os fagos de ligação de alta afinidade podem então ser capturados por esferas paramagnéticas revestidas com estreptoavidina. Esta “captura de equilíbrio” permite que os anticorpos sejam selecionados de acordo com suas afinidades de ligação, com uma sensibilidade que permite o isolamento de clones mutantes com uma afinidade tão pequena quanto duas vezes maior a partir de um grande excesso de fagos com afinidade mais baixa. As condições utilizadas na lavagem de fagos ligados a uma fase sólida podem também ser manipuladas para discriminar com base nas cinéticas de dissociação.

[194] Os clones de抗ígenos podem ser selecionados pela atividade. Clones Fv que correspondem a tais anticorpos para antígeno podem ser selecionados por; (1) isolamento de clones抗ígeno a partir de uma biblioteca de fago conforme descrito acima, e opcionalmente amplificando a

população isolada de clones fago por meio do crescimento da população em um hospedeiro bacteriano apropriado; (2) selecionando o antígeno e uma segunda proteína contra os quais a atividade de bloqueio e não bloqueio, respectivamente, é desejada; (3) adsorção dos clones fago de ligação ao antígeno para imobilizar o antígeno; (4) utilização de um excesso da segunda proteína para eluir qualquer clone indesejado que reconheça determinantes de ligação ao antígeno que sobreponha, ou compartilhe, determinantes de ligação com a segunda proteína; e (5) eluição dos clones que permaneceram adsorvidos após a etapa (4). Opcionalmente, os clones com as propriedades de bloqueio/não-bloqueio desejadas podem ser adicionalmente enriquecidos por meio da repetição dos procedimentos de seleção descritos uma ou mais vezes no presente.

[195] O DNA que codifica o anticorpo monoclonal derivado do hibridoma ou os clones Fv exibidos por fago da invenção são facilmente isolados e sequenciados pelo uso de procedimentos convencionais (por exemplo, pelo uso de *primers* de oligonucleotídeos desejados para amplificar especificamente as regiões codificantes da cadeia leve e pesada de interesse a partir de um molde (*template*) de DNA de hibridoma ou fago). Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão de expressão recombinante em bactérias de DNA que codifica anticorpo incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) e Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

[196] O DNA que codifica os clones Fv de acordo com a presente invenção pode ser combinado com sequências de DNA conhecidas que

codificam regiões constantes de cadeia leve e/ou pesada (por exemplo, as sequências de DNA apropriadas podem ser obtidas a partir de Kabat *et al.*, *Supra*), para formar clones que codificam cadeias leve e/ou pesada, de forma parcial ou integral. Aprecia-se que regiões constantes de qualquer isotipo possa ser utilizada para este propósito, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que estas regiões constantes possam ser obtidas a partir de qualquer espécie animal ou humana. Um clone Fv derivado do DNA de domínio variável de uma espécie animal (tal como humana) e então fundido ao DNA da região constante de outras espécies animais para formar sequências de codificação para "híbrido", cadeia leve e/ou cadeia pesada de comprimento total é incluída na definição de anticorpo "quimérico" e "híbrido", conforme utilizado no presente. Em uma realização preferida, um clone Fv derivado do DNA da região variável humana é fundido ao DNA da região constante humana para formar sequência(s) de codificação para cadeias leve e/ou pesada humana de comprimento total ou parcial.

[197] O DNA que codifica o anticorpo derivado de um hibridoma da invenção também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação para o domínio constante de cadeia leve e pesada, por sequências homólogas derivadas de clones hibridomas murinos (por exemplo, como no método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6851-6855 (1984)). O DNA que codifica o hibridoma ou o anticorpo derivado do clone Fv ou fragmentos podem ainda ser modificados por junção covalente à sequência codificadora de imunoglobulina na totalidade ou em parte da sequência de codificação para um polipeptídeo não-imunoglobulina. Desta forma, anticorpos "quimérico" ou "híbrido" são preparados tendo a especificidade de ligação do clone Fv ou anticorpo derivado do clone do hibridoma da invenção.

ESPECIFICIDADE Ao ANTÍGENO

[198] A presente invenção é aplicável a anticorpos de qualquer especificidade de ligação ao antígeno apropriada. Preferencialmente, os anticorpos da invenção são específicos para antígenos que são polipeptídeos biologicamente importantes. Mais preferivelmente, os anticorpos da invenção são úteis para a terapia ou diagnóstico de doenças ou distúrbios em um mamífero. Exemplos não limitantes de anticorpos terapêuticos incluem anticorpos anti-VEGF, anti-c-met, anti-IgE, anti-CD11, anti-CD18, anti-CD40, anti-fator tecidual (TF), anti-HER2 e anti-TrkC. Os anticorpos direcionados contra antígenos não polipeptídeo (tal como antígenos glicolipídeos associados a tumores; vide Patente US 5.091.178) também são contemplados.

[199] Quando o antígeno é um polipeptídeo, ele pode ser uma molécula transmembrana (por exemplo, receptor, tal como um receptor tirosina-quinase) ou um ligante, tal como um fator de crescimento. Antígenos exemplares incluem moléculas tais como a renina; hormônio do crescimento, incluindo o hormônio do crescimento humano e hormônio do crescimento bovino; fator de libertação do hormônio de crescimento; hormônio da paratiroide; hormônio estimulante da tireoide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; insulina de cadeia A; insulina de cadeia B; proinsulina; hormônio folículo estimulante; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação, tal como o fator VIIc, fator IX, fator tecidual (TF), e fator de von Willebrand; fatores anti-coagulantes, como a proteína C; fator natriurético atrial; surfactante pulmonar; ativador do plasminogênio, tal como a uroquinase ou urina humana ou ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase; RANTES (regulada mediante a ativação normalmente expressa e secretada por células T); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); albumina do soro, tal como a albumina do soro humano;

substância inibidora Muelleriana; cadeia A da relaxina; cadeia B da relaxina; prorelaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; proteína microbiana, tal como a beta-lactamase; DNase; IgE; antígeno associado ao linfócito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; proteína A ou D; fatores reumatóides; fator neurotrófico, tal como o fator neurotrófico derivado do osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou fator de crescimento neural, tal como o NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento de fibroblastos, tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF), tal como o TGF- alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator -I e-II de crescimento similar a insulina (IGF-I e IGF- II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação do fator de crescimento similar a insulina; proteínas CD, tal como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 e CD40; eritropoietina; fatores osteoindutores; imunotoxinas; proteína morfogenética óssea (BMP); um interferon, tal como o interferon-alfa,-beta, e-gama; fatores estimuladores de colónias (CSFs), por exemplo, M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs) , por exemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; receptores de células-T; proteínas de superfície da membrana; fator acelerador do decaimento; antígeno viral, tal como, por exemplo, uma porção do envelope do HIV; proteínas de transporte; receptores de *homing*; adressinas; proteínas reguladoras; integrinas, como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, um ICAM, VLA-4 e VCAM; antígeno associado a tumor, tal como HER2, HER3 ou receptor HER4, e fragmentos de quaisquer polipeptídeos listados acima.

[200] Antígenos exemplares para anticorpos abrangidos pela presente invenção incluem proteínas CD, tais como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 e CD46; membros da família de receptores ErbB como o receptor

de EGF, receptores HER2, HER3 ou HER4; moléculas de adesão celular, tais como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha 4/\beta 7$ e integrina $\alpha v/\beta 3$ incluindo tanto as subunidades α ou β destas (por exemplo, anticorpos anti-CD11a, anti-CD18 ou anti-CD11b); fatores de crescimento tal como o VEGF; fatores teciduais (TF); TGF- β , interferon-alfa (α -IFN) uma interleucina tal como a IL-8, IgE; antígenos do grupo sanguíneo; Apo2, receptor de morte, receptor flk2/flt3, receptor da obesidade (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, etc. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo da invenção se liga (em alguns exemplos de realização, se liga especificamente) a c-met.

FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

[201] A presente invenção engloba fragmentos de anticorpos. Em determinadas circunstâncias, há vantagem de se utilizar fragmentos de anticorpos ao invés de anticorpos completos. O menor o tamanho dos fragmentos permite a depuração rápida, e pode levar a um melhor acesso aos tumores sólidos.

[202] Foram desenvolvidas diversas técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio da digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos Fab, Fv e ScFv podem ser todos expressos e secretados em *E. coli* e assim permitindo a produção de grandes quantidades destes fragmentos. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂

podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Os fragmentos Fab e F(ab')₂ com maior meia-vida *in vivo* compreendendo resíduos de epítopos de ligação de receptores recuperados são descritos na patente US 5.869.046. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os técnicos no assunto. Em outras realizações, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv) (vide, por exemplo, o documento WO 93/16185 e as Patentes US 5.571.894 e US 5.587.458). O Fv e sFv são as únicas espécies com sítios de combinação intactos que são desprovidos de regiões constantes; por isso, elas são adequadas para a ligação não específica reduzida durante a utilização *in vivo*. As proteínas de fusão sFv podem ser construídas para gerar a fusão de uma proteína efetora na extremidade amino- ou carbóxi-terminal de um sFv. Vide *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. O fragmento de anticorpo pode ser também um “anticorpo linear”, por exemplo, conforme descrito na Patente US 5.641.870. Tais fragmentos de anticorpos lineares podem ser monoespecífico ou biespecíficos.

[203] Consequentemente, em alguns exemplos de realização, o anticorpo anti-c-met é um anticorpo de braço único (ou seja, o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve formam um único braço de ligação com antígeno) compreendendo uma região Fc, em que a região Fc compreende um primeiro e um segundo polipeptídeo Fc, onde o primeiro e segundo polipeptídeo Fc estão presentes em um complexo e formam uma região Fc, que aumenta a estabilidade do referido fragmento de anticorpo quando comparado com uma molécula Fab compreendendo o dito braço de ligação ao antígeno. Anticorpos de braço único são adicionalmente descritos na presente invenção.

ANTICORPOS HUMANIZADOS

[204] A presente invenção abrange anticorpos humanizados.

Vários métodos de humanização de anticorpos não humanos são conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, um anticorpo humanizado pode conter um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Esses resíduos de aminoácidos não humanos são muitas vezes denominados resíduos “importados”, que são tipicamente retirados de um domínio variável “importado”. A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), por meio da substituição de sequências de regiões hipervariáveis pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos “humanizados” são anticorpos quiméricos (US 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos da região hipervariável e, possivelmente, alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

[205] A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na fabricação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o então chamado método de “melhor adequação”, a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada em comparação com toda a biblioteca de sequências de domínio variável humano conhecido. A sequência humana que está mais próxima da sequência do roedor é então aceita como a região estrutural humana para o anticorpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901). Outro método utiliza uma região estrutural específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos

humanos de um subgrupo específico de cadeias leve ou pesada. A mesma região estrutural pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

[206] É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados mantendo a alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método, os anticorpos humanizados são preparados por meio de um processo de análise das sequências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das sequências parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais estão comumente disponíveis e são familiares para os técnicos do assunto. Programas de computador estão disponíveis e mostram e ilustram a provável estrutura conformacional tridimensional de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção dessas exibições permite a análise da provável função dos resíduos no funcionamento da possível sequência de imunoglobulina, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar ao seu antígeno. Desta forma, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências receptora e importada, de forma que seja atingida a característica de anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o(s) antígeno(s) alvo(s). De modo geral, os resíduos da região hipervariável estão diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência de ligação aos antígenos.

ANTICORPOS HUMANOS

[207] Anticorpos humanos da invenção podem ser construídos pela combinação da(s) sequência(s) do domínio variável do clone Fv selecionado a partir de uma biblioteca de exposição por fagos de origem humana com a(s) sequência(s) do domínio constante conhecida(s), conforme

descrito acima. Alternativamente, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser preparados por meio do método de hibridoma. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano/camundongo para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritos, por exemplo, por Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984), e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Estados Unidos, 1987) e Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

[208] Atualmente é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante a imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a deleção homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada de anticorpos (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem germinativa resulta na completa inibição da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linhagem germinativa humana em tais linhagens germinativa resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio de抗ígenos. Vide, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Brugermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993).

[209] O embaralhamento de genes (*gene shuffling*) pode também ser utilizado para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos não humanos, por exemplo, de roedores, em que o anticorpo humano possui afinidades e especificidades similares ao do anticorpo não humano inicial. De acordo com este método, que também é denominado “impressão de epítópos” (*epitope imprinting*), o gene da região variável de anticorpos não humanos tanto de cadeia leve como de cadeia pesada obtidos por meio da técnica de exibição de fagos, conforme descrito acima, é substituído com um repertório de

genes de domínio V humanos, criando um população de scFv ou Fab quiméricos com cadeia não humana/cadeia humana. A seleção com o antígeno resulta no isolamento de um Fab ou scFv quiméricos com cadeia não humana/cadeia humana onde a cadeia humana restaura o sítio de ligação de antígenos destruído, ou seja, o epítopo controla (imprime) a escolha da cadeia humana parceira. Quando o processo for repetido, a fim de substituir a cadeia não humana remanescente, um anticorpo humano é obtido (vide documento WO 93/06213, publicado em 1 de abril de 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos não humano por enxerto de CDR, esta técnica fornece anticorpos completamente humanos, que não possuem resíduos de CDR ou FR de origem não humana.

ANTICORPOS BIESPECÍFICOS

[210] Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferencialmente humanos ou humanizados, que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para o antígeno e a outra é para qualquer outro antígeno. Anticorpos biespecíficos exemplares podem se ligar a dois epítopos diferentes do antígeno. Os anticorpos biespecíficos podem também ser usados para concentrar agentes citotóxicos nas células que expressam o antígeno. Estes anticorpos possuem um braço de ligação ao antígeno e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferon- α , alcalóide de vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno marcado com isótopo radioativo). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos destes (por exemplo, anticorpos biespecíficos na forma $F(ab')_2$).

[211] Os métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na coexpressão de dois pares de cadeia

leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias pesadas possuem especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido a classificação aleatória de cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que normalmente é realizada através de etapas de cromatografia de afinidade, é um tanto problemática e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são descritos no documento WO 93/08829 publicado em 13 de maio de 1993, e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655 (1991).

[212] De acordo com uma abordagem diferente e, de maior preferência, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de antígeno e anticorpo) são fundidos à sequências de domínios constantes de imunoglobulina. A fusão está preferivelmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH₁) contendo o sítio necessário para ligação de cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são cotransfetados em um organismo hospedeiro apropriado. Isso proporciona grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipeptídeos em realizações quando razões desiguais das três cadeias de polipeptídeos utilizadas na construção fornecem os rendimentos ideais. É possível, entretanto, inserir as sequências de codificação para 2 ou todas as 3 cadeias de polipeptídeos em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipeptídeos em razões iguais resulta em alto

rendimento ou quando as razões não foram de nenhuma significância específica.

[213] Em um exemplo de realização da presente abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeias leve e pesada de imunoglobulina híbrida (que fornece uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que essa estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado a partir de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica proporciona uma forma fácil de separação. Esta abordagem é descrita no documento WO 94/04690. Para mais detalhes de produção de anticorpos biespecíficos vide, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[214] De acordo com outra abordagem, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser elaborada para maximizar o percentual de heterodímeros que são recuperados da cultura de célula recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio CH3 de um anticorpo de domínio constante. Neste método, uma ou mais das cadeias laterais pequenas de aminoácidos a partir da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano) (*knobs* ou protuberâncias). As “cavidades” compensatórias de tamanhos similares ou idênticos para a(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo pela substituição das cadeias laterais de aminoácidos grandes com cadeias menores (tal como alanina ou treonina). Esta realização fornece um mecanismo para o aumento no rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros. A estratégia de “knobs” e “holes” são adicionalmente

descritas na presente invenção.

[215] Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos “heteroconjugados” ou reticulados. Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, e outro a biotina. Tais anticorpos, por exemplo, foram propostos para dirigir células do sistema imune a células indesejadas (US 4.676.980), e para o tratamento de infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/00373, e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser fabricados através do uso de quaisquer métodos convenientes de reticulação. Agentes de reticulação apropriados são conhecidos no estado da técnica, e são descritos, por exemplo, na patente US 4.676.980, dentre uma série de técnicas de reticulação.

[216] As técnicas para a geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados utilizando ligações químicas. Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol - arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e evitar a 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 meio da redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado de Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

[217] Progressos recentes possibilitaram a recuperação direta dos fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225

(1992) descrevem a produção de uma molécula $F(ab')_2$ de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente a partir da *E. coli* e submetido ao acoplamento químico direcionado *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de ligar-se a células que superexpressam o receptor HER2 e células T humanas normais, bem como iniciar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano.

[218] Diversas técnicas de produção e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultura de células recombinante também foram descritas. Anticorpos biespecíficos foram produzidos, por exemplo, utilizando zíperes de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por meio de fusão gênica. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de dobradiça para formar monômeros e, em seguida, novamente oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de “diacorpo” descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para a fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L), por meio de um ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar-se com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, de maneira a formar dois sítios de ligação de抗ígenos. Também foi descrita outra estratégia para a fabricação de fragmentos de anticorpos

biespecíficos utilizando dímeros Fv de cadeia simples (sFv). Vide Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

[219] Anticorpos com mais de duas valências também são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

ANTICORPOS MULTIVALENTES

[220] Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rápido do que um anticorpo bivalente por uma célula que expressa um antígeno para o qual os anticorpos se ligam. Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos multivalentes (que são diferentes daqueles da classe IgM), com três ou mais sítios de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpos tetravalente), que podem ser facilmente produzidos pela expressão recombinante de ácidos nucleicos que codificam as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode incluir um domínio de dimerização e três ou mais sítios de ligação ao antígeno. O domínio de dimerização preferido compreende (ou consiste em) uma região Fc ou uma região de dobradiça. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc, e três ou mais sítios amino-terminais de ligação do antígeno a região Fc. O anticorpo multivalente preferido na presente invenção compreende (ou consiste de) três a oito, mas preferencialmente, quatro sítios de ligação antigênicos. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (e preferencialmente duas cadeias polipeptídicas), onde a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) compreende(m) dois ou mais domínios variáveis. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) pode(m) conter VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, onde VD1 é um primeiro domínio variável, VD2 é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipeptídeo, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) pode(,) compreender: A cadeia da região VH-CH1-ligante

flexível-VH-CH1-Fc, ou cadeia região VH-CH1-VH-CH1-Fc. O anticorpo multivalente na presente invenção, preferencialmente compreende ainda de pelo menos dois (e preferencialmente quatro) polipeptídeos de domínio variável de cadeia leve. O anticorpo multivalente da presente invenção pode, por exemplo, compreender entre cerca de dois a cerca de oito polipeptídeos do domínio variável de cadeia leve. Os polipeptídeos do domínio variável de cadeia leve contemplados na presente invenção compreendem um domínio variável de cadeia leve e compreendem, opcionalmente, um domínio CL.

ANTICORPOS VARIANTES

[221] Em alguns exemplos, a(s) modificaçāo(ões) na(s) sequência(s) de aminoácidos dos anticorpos descritos na presente invenção é(são) contemplada(s). Por exemplo, pode ser desejável melhorar a afinidade de ligação e/ou outras propriedades biológicas do anticorpo. As sequências de aminoácidos variantes do anticorpo são preparadas pela introdução de alterações nucleotídicas apropriadas no ácido nucleico do anticorpo, ou pela síntese peptídica. Essas modificações incluem, por exemplo, deleções e/ou inserções e/ou substituições de resíduos dentro das sequências de aminoácidos do anticorpo. Qualquer combinação de exclusão, inserção e substituição é feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua as características desejadas. As alterações nos aminoácidos podem ser introduzidas na sequência de aminoácidos do anticorpo em questão no momento em que sequência é feita

[222] Um método útil para a identificação de determinados resíduos ou regiões do anticorpo que são locais preferidos para mutagênese é denominado “mutagênese de varredura de alanina”, conforme descrito por Cunningham e Wells, (1989) *Science*, 244: 1081-1085. Na presente invenção, um resíduo alvo ou grupo de resíduos alvos é identificado (por exemplo, resíduos carregados, tais como arg, asp, his, lis e glu) e substituído por um

aminoácido neutro ou negativamente carregado (preferivelmente alanina ou polialanina) para afetar a interação dos aminoácidos com antígeno. Esses locais de aminoácidos que demonstram sensibilidade funcional às substituições são então refinados pela introdução de outras variantes ou variantes adicionais nos sítios, ou para os sítios, de substituição. Desta forma, enquanto o sítio para introdução de uma variação de sequência de aminoácidos é predeterminada, a natureza intrínseca da mutação não necessita ser predeterminada. Por exemplo, para analisar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, a varredura de ala ou a mutagênese aleatória é conduzida no códon ou região alvo e as imunoglobulinas expressas são selecionadas pela atividade desejada.

[223] As inserções de sequências de aminoácidos incluem fusões de carbóxi- e/ou amino-terminais que variam de comprimento desde um resíduo, até polipeptídeos que possuem cem ou mais resíduos, bem como inserções intra-sequenciais de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionil N-terminal ou anticorpo fundido a um polipeptídeo citotóxico. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao N- ou C-terminal do anticorpo à uma enzima (por exemplo, ADEPT) ou um polipeptídeo que aumente a meia vida do anticorpo no soro.

[224] A glicosilação de polipeptídeos é tipicamente tanto N-ligada quanto O-ligada. N-ligada refere-se à ligação da unidade de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripeptídeos asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da unidade de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Desta forma, a presença de qualquer destas sequências de tripeptídeos no polipeptídeo cria um sítio de glicosilação em potencial. A glicosilação O-ligada refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetylgalactosamina, galactose, ou

xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser utilizados.

[225] A adição de sítios de glicosilação ao anticorpo é acompanhada, de forma conveniente, pela alteração da sequência de aminoácido de modo que esta sequência contenha uma ou mais das sequências de tripeptídeos descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração pode também ser feita através da adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo ou polipeptídeo original (para sítios de glicosilação O-ligados).

[226] Quando o anticorpo compreende uma região Fc, os carboidratos ligados a estes podem ser alterados. Por exemplo, anticorpos com uma estrutura de carboidrato madura que carece de fucose anexada a uma região Fc do anticorpo são descritos no Pedido de Patente US 2003/0157108 (Presta, L.). Veja também a US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Anticorpos com uma bissecção por N-acetilglicosamina (GlcNAc) nos carboidratos ligados a uma região Fc do anticorpo são referidos no documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* e na Patente US 6.602.684, Umana *et al.* Anticorpos com pelo menos um resíduo de galactose no oligossacarídeo ligado a uma região Fc do anticorpo são descritos no documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Veja, também, o documento WO 1998/58964 (Raju, S.) e WO 1999/22764 (Raju, S.) sobre anticorpos com carboidratos alterados anexados à região Fc deste. Vide também US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de ligação a抗ígenos com glicosilação modificada.

[227] A variante de glicosilação preferida na presente invenção compreende uma região Fc, em que uma estrutura de carboidrato ligada à região Fc carece de fucose. Essas variantes podem ter a função ADCC melhorada. Opcionalmente, a região Fc compreende uma ou mais substituições de aminoácidos que melhoram ainda mais a função ADCC, por

exemplo, substituições nas posições 298, 333, e/ou 334 da região Fc (numeração de resíduos Eu). Exemplos de publicações relacionadas com variantes de anticorpos "defucosilados" ou "com deficiência de fucose" incluem: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Exemplos de linhagens de células produtoras de anticorpos defucosilados incluem células Lec13 CHO deficiente na proteína de fucosilação (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 249:533-545 (1986); pedido de Patente US 2003/0157108 A1, Presta, L. e WO 2004/056312 A1 Adams *et al.*, especialmente no Exemplo 11), e linhagens de células nocautes, tal como as células CHO nocautes para o gene alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, (Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 87:614 (2004)).

[228] Em um aspecto, a invenção fornece um fragmento de anticorpo compreendendo pelo menos uma característica que promove a heterodimerização, enquanto minimiza a homodimerização, das sequências Fc dentro do fragmento de anticorpo. Essa(s) característica(s) melhora(m) a produtividade e/ou grau de pureza e/ou homogeneidade das populações de imunoglobulinas obtidas pelos métodos da invenção conforme descrito no presente. Em um exemplo de realização, um primeiro polipeptídeo Fc e um segundo polipeptídeo Fc encontram/interagem em uma interface. Em alguns exemplos de realização o primeiro e segundo polipeptídeo Fc se encontram em uma interface, a interface do segundo polipeptídeo Fc (sequência) compreende uma protuberância (também designado de "knob" (ou botão)) que é posicionável em uma cavidade (também designada de "hole" (ou buraco)) na primeira interface do polipeptídeo Fc (sequência). Em um exemplo de

realização, o primeiro polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a cavidade ou o segundo polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a protuberância, ou ambos. Em um exemplo de realização, o primeiro polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a cavidade e o segundo polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a protuberância. Em um exemplo de realização, a interface do segundo polipeptídeo Fc compreende uma protuberância que é posicionável em uma cavidade na interface do primeiro polipeptídeo Fc, em que a cavidade ou protuberância, ou ambos, foram introduzidas na interface do primeiro e segundo polipeptídeo Fc, respectivamente. Em alguns exemplos de realização em que o primeiro e segundo polipeptídeo Fc se encontram em uma interface, a interface do primeiro polipeptídeo Fc (sequência) compreende uma protuberância que é posicionável em uma cavidade na interface do segundo polipeptídeo Fc (sequência). Em um exemplo de realização, o segundo polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a cavidade ou o primeiro polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a protuberância, ou ambos. Em um exemplo de realização, o segundo polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a cavidade e o primeiro polipeptídeo Fc foi alterado a partir de um polipeptídeo molde/original para codificar a protuberância. Em um exemplo de realização, a interface do primeiro polipeptídeo Fc compreende uma protuberância que é posicionável em uma cavidade na interface do segundo polipeptídeo Fc, em que a cavidade ou protuberância, ou ambos, foram introduzidas na interface do primeiro e segundo polipeptídeo Fc, respectivamente.

[229] Em um exemplo de realização, cada protuberância e

cavidade compreendem um resíduo de aminoácido de ocorrência natural. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo a protuberância é gerado pela substituição de um resíduo original a partir da interface de um polipeptídeo molde/original com um resíduo importado possuindo uma cadeia lateral maior do que o resíduo original. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo a protuberância é gerado por um método compreendendo uma etapa em que o polinucleotídeo que codifica um resíduo original a partir da interface do dito polipeptídeo é substituído por um polinucleotídeo codificante de um resíduo importado possuindo uma cadeia lateral maior do que a cadeia lateral original. Em um exemplo de realização, o resíduo original é treonina. Em um exemplo de realização, o resíduo original é T366. Em um exemplo de realização, o resíduo importado é arginina (R). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é fenilalanina (F). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é tirosina (Y). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é triptofano (W). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é R, F, Y ou W. Em um exemplo de realização, uma protuberância é gerada pela substituição de uma ou mais resíduos em um polipeptídeo molde/original. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma protuberância compreende a substituição da treonina na posição 366 por triptofano, a numeração dos aminoácidos é de acordo com o esquema de numeração EU de Kabat *et al.* (págs. 688-696 em “Sequences of proteins of immunological interest”, 5^a ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)).

[230] Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo a cavidade é gerado pela substituição de um resíduo original na interface de um polipeptídeo molde/original com um resíduo importado possuindo uma cadeia lateral menor do que ao do resíduo original. Por exemplo, o polipeptídeo Fc compreendendo a cavidade pode ser gerado por um método compreendendo uma etapa em que o polinucleotídeo que codifica

um resíduo original a partir da interface do dito polipeptídeo é substituído por um polinucleotídeo codificante de um resíduo importado possuindo uma cadeia lateral de volume menor do que a cadeia lateral original. Em um exemplo de realização, o resíduo original é treonina. Em um exemplo de realização, o resíduo original é leucina. Em um exemplo de realização, o resíduo original é tirosina. Em um exemplo de realização, o resíduo importado não é cisteína (C). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é alanina (A). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é serina (S). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é treonina (T). Em um exemplo de realização, o resíduo importado é valina (V). Uma cavidade pode ser gerada pela substituição de um ou mais resíduos originais de um polipeptídeo molde/original. Por exemplo, em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma cavidade compreende a substituição de dois ou mais aminoácidos originais selecionados a partir do grupo consistindo em treonina, leucina e tirosina. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma cavidade compreende dois ou mais resíduos importados selecionados a partir do grupo que consiste de alanina, serina, treonina e valina. Em alguns exemplos de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma cavidade compreende a substituição de dois ou mais aminoácidos originais selecionados entre o grupo que consiste de treonina, leucina e tirosina, e em que os referidos aminoácidos originais são substituídos por resíduos importados selecionados a partir do grupo que consiste de alanina, serina, treonina e valina. Em alguns exemplos de realização, o aminoácido original que é substituído é T366, L368 e/ou Y407. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma cavidade compreende a substituição da treonina na posição 366 por serina, a numeração dos aminoácidos é de acordo com o esquema de numeração EU de Kabat *et al. Supra*. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma

cavidade compreende a substituição da leucina na posição 368 por alanina, a numeração dos aminoácidos é de acordo com o esquema de numeração EU de Kabat *et al. Supra*. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma cavidade compreende a substituição da tirosina na posição 407 por valina, a numeração dos aminoácidos é de acordo com o esquema de numeração EU de Kabat *et al. Supra*. Em um exemplo de realização, o polipeptídeo Fc compreendendo uma cavidade compreende duas ou mais substituições de aminoácidos selecionadas a partir do grupo consistindo em T366S, L368A e Y407V, e a numeração dos aminoácidos é feita de acordo com o esquema de numeração EU de Kabat *et al. Supra*. Em alguns exemplos de realização destes fragmentos de anticorpos, o polipeptídeo Fc compreendendo a protuberância compreende a substituição da treonina na posição 366 por triptofano, e o sistema de numeração dos aminoácidos segue o esquema de numeração EU de Kabat *et al. Supra*.

[231] Em uma realização, o anticorpo compreende mutações em Fc constituindo protuberâncias “knobs” e cavidades “holes” conforme descrito no documento WO2005/063816. Por exemplo, uma mutação “hole” pode ser um ou mais dentre T366A, L368A e/ou Y407V em um polipeptídeo Fc, e uma mutação “knob” pode ser T366W.

[232] Outro tipo de variante é uma variante de substituição de aminoácidos. Essas variantes têm pelo menos um resíduo aminoácido (pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos 4 ou mais) na molécula de anticorpo substituído por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para mutagênese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas também são contempladas alterações nas FRs. Substituições conservadoras são exibidas na Tabela A sob o título de “substituições preferidas”. Se tais substituições resultarem em uma mudança na atividade biológica, neste caso mais mudanças substanciais, denominadas “substituições exemplares” na

Tabela A, ou conforme adicionalmente descrito mais abaixo em referência as classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos selecionados.

TABELA A

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lis; Gln; Asn	Lis
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lis; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cis (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gli (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lis; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Fen; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Fen	Ile
Lis (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Fen; Ile	Leu
Fen (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tir	Tir
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Tre	Tre
Tre (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tir; Fen	Tir
Tir (Y)	Trp; Fen; Tre; Ser	Fen
Val (V)	Ile; Leu; Met; Fen; Ala; Norleucina	Leu

[233] Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são obtidas por meio da seleção de substituições que diferem significativamente em seus efeitos sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, na forma

de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio desejado; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral

- (1) Hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: Cis, Ser, Tre, Asn, Gln;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: his, lis, arg;
- (5) resíduos que influenciam na orientação das cadeias: gli, pro; e
- (6) aromático: trp, tir, fen.

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

[235] Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, anticorpo humano e humanizado). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para o desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas melhoradas com relação ao anticorpo parental do qual eles foram gerado. Uma maneira conveniente para gerar tais variantes de substituição envolve a maturação de afinidade utilizando a exibição de fago. Resumidamente, diversos sítios de regiões hipervariáveis (por exemplo, 6 a 7 sítios) sofrem mutações para gerar todas as possíveis substituições amino em cada sítio. Os anticorpos gerados dessa forma são exibidos a partir de partículas de fago filamentoso como fusões no produto do gene III do M13 embalado dentro de cada partícula. As variantes exibidas por fago são, então, triadas de acordo com a sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) conforme divulgado na presente invenção. A fim de identificar sítios de regiões hipervariáveis candidatos para a modificação, a mutagênese por varredura de alanina pode ser realizada para

identificar resíduos de regiões hipervariáveis que contribuem significativamente para a ligação ao antígeno. Alternativamente ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar a estrutura cristalina do complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e o antígeno. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para a substituição de acordo com as técnicas elaboradas na presente invenção. Uma vez que tais variantes são produzidas, o painel de variantes é submetido à seleção conforme descrito na presente invenção e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

[236] As moléculas de ácidos nucleicos que codificam sequência de aminoácidos variantes do anticorpo são preparadas por meio de uma série de métodos conhecidos no estado da técnica. Estes métodos incluem, mas não se limitam a, o isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequências de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação por meio de mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio-dirigida), mutagênese por PCR e cassete de mutagênese de uma variante preparada anteriormente ou uma versão não variante do anticorpo.

[237] Pode ser desejável introduzir uma ou mais modificações de aminoácidos em uma região Fc dos polipeptídeos de imunoglobulina da invenção, gerando assim uma região Fc variante. A região Fc variante humana pode compreender uma sequência da região Fc (por exemplo, sequência da região Fc da IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) compreendendo uma modificação de aminoácido (por exemplo, uma substituição) em um ou mais posições de aminoácidos incluindo o de uma dobradiça de cisteína.

[238] De acordo com esta descrição e os ensinamentos do estado da técnica, contempla-se que em alguns exemplos de realização um anticorpo usado nos métodos da invenção pode compreender uma ou mais alterações

em comparação com a contraparte homóloga do tipo selvagem, por exemplo, na região Fc. Estes anticorpos, porém, mantém sensivelmente as mesmas características exigidas para a utilidade terapêutica, comparativamente ao seu homólogo do tipo selvagem. Por exemplo, podem ser feitas algumas alterações na região Fc, que alteraram (isto é, ou melhoram ou diminuem) a ligação ao C1q e/ou a citotoxicidade dependente do complemento (CDC), por exemplo, como descrito no documento WO99/51642. Vide também Duncan e Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente US 5.648.260; Patente US 5.624.821, e documento WO94/29351 relativas a outros exemplos de região Fc variantes. O documento WO00/42072 (Presta) e WO 2004/056312 (Lowman) descrevem variantes de anticorpos com ligação ao FcRs melhorada ou diminuída. O conteúdo dessas publicações de patentes é especificamente incorporado ao presente pela referência. Vide também, por exemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001). Anticorpos com a meia vida aumentada e ligação ao receptor Fc neonatal (FcRn) melhorada, que são responsáveis pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), são descritos na US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estes anticorpos compreendem uma região Fc, com uma ou mais substituições neste local que melhoram a ligação da região Fc ao FcRn. As variantes de polipeptídeos com sequências de aminoácidos da região Fc alteradas e capacidade de ligação ao C1q aumentada ou diminuída estão descritas na Patente US 6.194.551 B1, e documento WO99/51642. O conteúdo dessas publicações de patentes é especificamente incorporado ao presente pela referência. Vide, também, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

ANTICORPOS DERIVATIVOS

[239] Os anticorpos da invenção podem ser adicionalmente modificados para conter moléculas adicionais não proteinárias que são

conhecidas na técnica e prontamente disponíveis. Preferivelmente, as moléculas adequadas para derivatização do anticorpo são polímeros hidrossolúveis. Exemplos não limitantes de polímeros hidrossolúveis incluem, mas não se limitando a, polietilenoglicol (PEG), copolímeros de etileno-glicol/propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico, policloreto pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero etileno/maleica anidrido, poliaminoácidos (homopolímeros ou copolímeros aleatórios), e dextrano ou poli (n-vinil pirrolidona) polietilenoglicol, homopolímeros de propropileno glicol, co-polímeros de óxido de prolipropileno óxido de etileno, poliálcool polióis (por exemplo, glicerol), álcool polivinílico, e suas misturas. O polietilenoglicol propionaldeído pode ter vantagens no processo de fabricação devido à sua estabilidade na água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificada ou sem ramificação. O número de polímeros acoplados por anticorpo pode variar, e se mais de um polímero encontra-se anexo, os polímeros podem ser a mesma molécula ou moléculas diferentes. Em geral, o número e/ou tipo de polímeros utilizado para derivatização pode ser determinado com base em considerações, incluindo, mas não se limitado a, propriedades específicas ou funções do anticorpo de ser melhorado, se os anticorpos derivados serão utilizados no âmbito de uma terapia, etc.

TRIAGEM DE ANTICORPOS COM PROPRIEDADES DESEJADAS

[240] Os anticorpos da presente invenção podem ser caracterizados por suas propriedades físicas/químicas e funções biológicas por diversos ensaios conhecidos no estado da técnica (alguns dos quais estão divulgados na presente invenção). Por exemplo, os anticorpos podem ser adicionalmente caracterizados por uma série de ensaios, incluindo, mas não se limitando, ao sequenciamento N-terminal, análise de aminoácidos,

cromatografia líquida de alta pressão por exclusão de tamanho (HPLC) não desnaturalante, espectrometria de massa, cromatografia de troca iônica e digestão pela papaína.

[241] Em alguns exemplos de realização da invenção, os anticorpos produzidos são analisados quanto a suas atividades biológicas. Em alguns exemplos de realização, os anticorpos da presente invenção são testados quanto a suas atividades de ligação ao antígeno. Os ensaios de ligação ao antígeno que são conhecidos no estado da técnica e podem ser usados no presente, incluem, mas não estão limitados a, qualquer ensaio de ligação competitivo ou direto usando técnicas como *Western blots*, radioimunoensaio, ELISA (ensaio imunoadsorvente enzima-associado), imunoensaios do tipo “sanduíche”, ensaios de imunoprecipitação, imunoensaios fluorescentes, e imunoensaios com proteína A. Os ensaios ilustrativos são fornecidos abaixo na seção Exemplos.

VETORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS RECOMBINANTES

[242] Para a produção recombinante de um polipeptídeo heterólogo (por exemplo, um anticorpo), os ácidos nucleicos que codificam este polipeptídeo são isolados e inseridos em um vetor de clonagem replicável para clonagem adicional (amplificação do DNA), ou para expressão. O DNA codificante do polipeptídeo (por exemplo, anticorpo) é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (utilizando, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve do anticorpo). Muitos vetores estão disponíveis. A escolha do vetor depende em parte da célula hospedeira a ser utilizada. Geralmente, as células hospedeiras preferidas são de origem procariótica. Aprecia-se que regiões constantes de qualquer isotipo possa ser utilizada para este propósito, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que estas regiões constantes possam ser obtidas a partir de

qualquer espécie animal ou humana.

A. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS UTILIZANDO CÉLULAS HOSPEDEIRAS PROCARIÓTICAS

I. CONSTRUÇÃO DE VETORES

[243] As sequências de polinucleotídeos que codificam os componentes de polipeptídeos do polipeptídeo (por exemplo, anticorpo) da invenção podem ser obtidas por meio de técnicas recombinantes. As sequências de polinucleotídeos desejadas podem ser isoladas e sequenciadas a partir de células produtoras de anticorpos, tais como as células de hibridoma. Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser sintetizados usando um sintetizador de nucleotídeo ou por técnicas de PCR. Uma vez obtidos, as sequências de codificação dos polipeptídeos são inseridas em um vetor recombinante capaz de replicar e expressar os polinucleotídeos heterólogos nos hospedeiros procarióticos. Muitos vetores que estão disponíveis e são conhecidos no estado da técnica podem ser utilizados para os propósitos da presente invenção. A seleção de um vetor apropriado dependerá principalmente do tamanho dos ácidos nucleicos a serem inseridos no vetor e da célula hospedeira específica que será transformada com o vetor. Cada vetor contém vários componentes, dependendo da sua função (amplificação ou expressão de polinucleotídeo heterólogo, ou ambos) e sua compatibilidade com a célula hospedeira específica em que ele reside. Os componentes do vetor incluem, mas não estão limitados a: uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um sítio de ligação do ribossomo (RBS), uma sequência de sinal, a inserção de ácido nucleico heterólogo e uma sequência de término de transcrição.

[244] De modo geral, vetores plasmidiais contendo *replicon* e sequências de controle que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são utilizados em conexão com esses hospedeiros. Normalmente o vetor carrega um sítio de replicação, bem como sequências

marcadoras que são capazes de fornecer a seleção fenotípica nas células transformadas. Por exemplo, a *E. coli* é normalmente transformada usando o pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie *E. coli*. O pBR322 contém genes de resistência que codificam a ampicilina (Amp) e tetraciclina (Tet) e, portanto, fornece meios fáceis para a identificação de células transformadas. O pBR322, seus derivados, ou outros plasmídeos microbianos ou bacteriófagos também podem conter, ou serem modificados para deste modo conter, os promotores que podem ser usadas pelo organismo microbiano para a expressão de proteínas endógenas. Exemplos de derivados do pBR322 utilizados para expressão de anticorpos específicos estão descritos detalhadamente em Carter *et al.*, Patente US 5.648.237.

[245] Além disso, os vetores fagos contendo replicon e sequências controle que são compatíveis com o microrganismo hospedeiro podem ser usados como vetores de transformação em conexão com esses hospedeiros. Por exemplo, o bacteriófago como o λGEM.TM.-11 pode ser utilizado na produção de um vetor recombinante que pode ser usado para transformar células hospedeiras suscetíveis, tal como a *E. coli* LE392.

[246] O vetor de expressão da presente invenção pode compreender dois ou mais pares de *cistron* promotor, cada um codificando um dos componentes de polipeptídeos. Um promotor é uma sequência não traduzida reguladora localizada a montante (5') de um *cistron* que modula sua expressão. Os promotores procarióticos geralmente caem em duas classes, induzíveis e constitutivos. O promotor induzível é um promotor que inicia níveis aumentados de transcrição do *cistron* sob seu controle em resposta a alterações na condição de cultura, por exemplo, a presença ou ausência de um nutriente ou mudança na temperatura.

[247] Um grande número de promotores reconhecidos por uma série de células hospedeiras potenciais é conhecido. O promotor selecionado

pode ser operacionalmente ligado ao *cistron* de DNA que codifica a cadeia leve ou pesada pela remoção do promotor a partir do DNA fonte por meio da digestão enzimática com enzimas de restrição e inserção da sequência promotora isolada no vetor da invenção. A sequência nativa do promotor e de muitos promotores heterólogos pode ser usada para direcionar a amplificação e/ou expressão dos genes alvo. Em alguns exemplos de realização, os promotores heterólogos são utilizados, pois eles geralmente permitem uma maior transcrição e maior rendimento do gene alvo expresso em comparação com o promotor do polipeptídeo alvo nativo.

[248] Os promotores apropriados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem o promotor *phoA*, sistemas promotores da lactose e β -lactamase, um sistema promotor do triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac* ou o *trc*. No entanto, outros promotores que são funcionais em bactérias (por exemplo, outros promotores bacterianos ou de fago conhecidos) também são adequados. Suas sequências de nucleotídeos foram publicadas, permitindo assim que um técnico hábil no assunto possa liga-los de maneira operável (operacionalmente ligado) aos *cistrons* que codificam as cadeias pesadas e leves alvos (Siebenlist *et al.*, (1980) Cell 20: 269) usando ligantes ou adaptadores para suprir qualquer sítio de restrição desejado.

[249] Em um aspecto da invenção, cada *cistron* dentro do vetor recombinante compreende um componente da sequência sinal de secreção que direciona a translocação dos polipeptídeos expressos através da membrana. Em geral, a sequência sinal pode ser um componente do vetor, ou pode ser uma parte do DNA do polipeptídeo alvo que é inserida no vetor. A sequência sinal selecionada para os propósitos da presente invenção pode ser aquela que é reconhecida e processada (ou seja, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas que não

reconhecem e processam as sequências-sinal nativas para os polipeptídeos heterólogos, a sequência sinal é substituída por uma sequência sinal procariótica selecionada, por exemplo, a partir dos polipeptídeos sinal da presente invenção. Além disso, o vetor pode compreender uma sequência sinal selecionada a partir do grupo que consiste de; fosfatase alcalina, penicilinase, Lpp, ou líderes da enterotoxina II estável ao calor (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP.

[250] Em um aspecto da invenção, um ou mais polinucleotídeos (por exemplo, vetores de expressão) codificam coletivamente um anticorpo de braço único. Em um exemplo de realização, um único polinucleotídeo codifica (a) os componentes de cadeia leve e pesada do anticorpo de braço único, e (b) o polipeptídeo Fc. Em um exemplo de realização, um único polinucleotídeo codifica os componentes da cadeia leve e pesada do anticorpo de braço único, e um polinucleotídeo separado codifica o polipeptídeo Fc. Em um exemplo de realização, polinucleotídeos distintos codificam o componente da cadeia leve do anticorpo de braço único, o componente da cadeia pesada do anticorpo de braço único e o polipeptídeo Fc, respectivamente. A produção de um anticorpo de braço único é descrita, por exemplo, no documento WO2005063816.

[251] As células hospedeiras procarióticas adequadas para a expressão de anticorpos da invenção incluem *Archaeabacteria* e *Eubacteria*, tais como organismos *gram- negativos* ou *gram-positivos*. Exemplos de bactérias úteis incluem a *Escherichia* (por exemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por exemplo, *B. subtilis*), Enterobactérias, espécies de *Pseudomonas* (por exemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* ou *Paracoccus*. Em um exemplo de realização, são usadas células *gram-negativas*. Em um exemplo de realização, as células de *E. coli* são usadas como hospedeiros para a invenção. Exemplos das cepas de *E. coli* incluem as cepas W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*,

vol. 2 (Washington, D.C.: *American Society for Microbiology*, 1987), págs. 1190-1219; Depósito ATCC Nº: 27.325) e seus derivados, incluindo a cepa 33D3 possuindo o genótipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente US 5.639.635) e as cepas 63C1 e 64B4. Outras cepas e derivados destas, tal como a *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) também são adequadas. Estes exemplos são ilustrativos e não limitantes. Os métodos para a construção de derivados de qualquer uma das bactérias mencionadas acima que possuem genótipo definido são conhecidos no estado da técnica, por exemplo, em Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). Geralmente é necessário selecionar as bactérias adequadas levando em consideração a replicabilidade do *replicon* nas células de uma bactéria. Por exemplo, as espécies *E. coli*, *Serratia* ou *Salmonella* podem ser utilizadas como hospedeiras de maneira adequada, quando plasmídeos bem conhecidos, tais como os plasmídeos pBR322, pBR325, pACYC177 ou pKN410 são utilizados para a construção do *replicon*. Normalmente a célula hospedeira deve secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inibidores da protease adicionais podem ser incorporados na cultura celular.

II. PRODUÇÃO DE ANTICORPO

[252] As células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão descritos acima e cultivadas em meio nutriente convencional modificado de forma a ser apropriado para a indução dos promotores, seleção dos transformantes ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas.

[253] Transformação significa a introdução de DNA no hospedeiro procariótico de forma que o DNA seja replicável, quer seja como um elemento extracromossômico ou como um integrante cromossômico. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é feita utilizando técnicas padrões

apropriada para tais células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio é geralmente utilizado para células bacterianas que possuem barreiras substanciais da parede celular. Outro método de transformação emprega o polietileno glicol/DMSO. Uma outra técnica usada é a eletroporação.

[254] As células procarióticas utilizadas para produzir os polipeptídeos da presente invenção são cultivadas em meios conhecidos no estado da técnica e são adequadas para cultivo das células hospedeiras selecionadas. Exemplos de meios apropriados incluem caldo lúria (LB) mais os suplementos nutrientes necessários. Em alguns exemplos de realização, os meios também contêm um agente de seleção, selecionado com base na construção do vetor de expressão, para permitir o crescimento seletivo de células procarióticas que contenham o vetor de expressão. Por exemplo, a ampicilina é adicionada ao meio para o crescimento de células que expressam o gene de resistência à ampicilina.

[255] Quaisquer suplementos necessários além de fontes de carbono, nitrogênio e fosfato inorgânico podem também ser incluídos em concentrações apropriadas introduzidas isoladamente ou como uma mistura com outro suplemento ou meio tal como uma fonte de nitrogênio complexa. Opcionalmente, o meio de cultivo pode conter um ou mais agentes redutores selecionados a partir do grupo que consiste de glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotreitol.

[256] As células hospedeiras procarióticas são cultivadas sob temperaturas apropriadas. Para crescimento da *E. coli*, por exemplo, a temperatura preferida varia entre cerca de 20 °C a 39 °C, mais preferivelmente entre 25 °C a cerca de 37 °C, e ainda mais preferivelmente cerca de 30 °C. O pH do meio pode ser qualquer pH que entre 5 a 9, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Para a *E. coli*, o pH é preferencialmente de cerca de 6,8 a 7,4, de preferencialmente é de 7,0.

[257] Se um promotor induzível é utilizado no vetor de expressão da invenção, a expressão da proteína é induzida em condições adequadas para a ativação do promotor. Em um aspecto da invenção, promotores PhoA são usados para controlar a transcrição dos polipeptídeos. Assim, as células hospedeiras modificadas são cultivadas em um meio limitante de fosfato para a indução. Preferencialmente, o meio limitante de fosfato é o meio C.R.A.P. (vide, por exemplo, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods.* (2002), 263:133-147), ou o meio descrito no documento WO2002/061090. Uma variedade de outros indutores pode ser utilizada, de acordo com a construção do vetor utilizado, como é conhecido no estado da técnica.

[258] Em um exemplo de realização, os polipeptídeos expressos da presente invenção são secretados e recuperados a partir do periplasma das células hospedeiras. A recuperação da proteína envolve tipicamente o rompimento do micro-organismo, geralmente por meios como o choque osmótico, sonicação ou lise. Após o rompimento das células, fragmentos celulares ou células inteiras podem ser removidos por meio da centrifugação ou filtragem. As proteínas podem ser adicionalmente purificadas, por exemplo, por cromatografia de afinidade em resina. Alternativamente, as proteínas podem ser transportadas para o meio de cultivo e isoladas nele. As células podem ser removidas do cultivo e o sobrenadante da cultura filtrado e concentrado para purificação adicional das proteínas produzidas. Os polipeptídeos expressos podem ser adicionalmente isolados e identificados utilizando métodos comumente conhecidos, tais como a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio de *Western Blot*.

[259] Em um aspecto da invenção, a produção do anticorpo é realizada em grande quantidade por meio de processos de fermentação. Vários procedimentos de fermentação descontínua alimentada (*fed-batch*) em larga escala estão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes. As

fermentações em larga escala possuem capacidade de pelo menos 1000 litros, preferencialmente de 1000 a 100.000 litros de capacidade. Estes fermentadores utilizam pás agitadoras ou outros meios apropriados para distribuir oxigênio e nutrientes, especialmente glicose (uma fonte de carbono/energia preferida). A fermentação em pequena escala refere-se geralmente a fermentação em um fermentador que possui capacidade volumétrica não maior que cerca de 100 litros e pode variar de cerca de um 1 litro a 100 litros.

[260] No processo de fermentação, a indução da expressão de proteína é tipicamente iniciada após o crescimento das células sob condições adequadas até uma densidade desejada, tal como em uma OD₅₅₀ de cerca de 180 a 220, no qual as células estão iniciando a fase estacionária. Uma série de indutores pode ser utilizada, de acordo com a construção de vetor empregado, conforme é sabido no estado da técnica e descrito anteriormente. As células podem ser cultivadas por períodos mais curtos antes da indução. As células normalmente são induzidas durante cerca de 12 a 50 horas, embora possa ser utilizado um tempo maior ou menor de indução.

[261] Para melhorar adicionalmente o rendimento de produção e a qualidade dos polipeptídeos da presente invenção, várias condições de fermentação podem ser modificadas. Para melhorar a montagem e enovelamento adequado do anticorpo secretado, por exemplo, vetores adicionais que superexpressam proteínas chaperonas, tais como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e/ou DsbG) ou FkpA (peptidilprolil cis, trans-isomerase com atividade de chaperona) podem ser utilizados para co-transformar as células hospedeiras procarióticas. Demonstrou-se que as proteínas de chaperona facilitam o enovelamento adequado e solubilidade de proteínas heterólogas produzidas em células hospedeiras bacterianas. Chen *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente US

6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente US 6.027.888; Bothmann e Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm e Pluckthun, (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.*, (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210. Em alguns exemplos de realização, DsbA e C são expressos na célula hospedeira bacteriana.

[262] Para minimizar a proteólise de proteínas heterólogas expressas (especialmente as que são proteoliticamente sensíveis) certas linhagens hospedeiras com deficiência de enzimas proteolíticas podem ser utilizadas para a presente invenção. Por exemplo, linhagens de células hospedeiras procarióticas podem ser modificadas para efetuar mutação(ões) genética(s) nos genes que codificam proteases bacterianas conhecidas, tais como Protease III, OmpT, DegP, Tsp, TonA, PhoA, Protease I, Protease Mi, Protease V, Protease VI e combinações destas. Algumas linhagens de *E. Coli* com deficiência de proteases estão disponíveis e descritas, por exemplo, em Joly *et al.*, (1998) supra; Georgiou *et al.* Patente US 5.264.365, Georgiou *et al.* Patente US 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[263] Em um exemplo de realização, as cepas de *E. coli* deficientes de enzimas proteolíticas e transformadas com um ou mais plasmídeos que supereexpressam proteínas chaperonas são utilizadas como células hospedeiras no sistema de expressão da invenção.

III. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO

[264] Podem ser empregados métodos-padrão para a purificação de proteína conhecidos no estado da técnica. Os procedimentos a seguir são exemplos de procedimentos de purificação adequados: fracionamento em uma coluna de imunoafinidade ou de troca iônica, precipitação em etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica ou em uma resina de troca catiônica, como DEAE, cromatofocusação, SDS-PAGE, precipitação em sulfato de amônio, filtração em gel usando, por exemplo, Sephadex G -75.

[265] Em um aspecto a proteína A imobilizada em uma fase sólida é utilizada para a purificação por imunoafinidade dos produtos anticorpos da invenção. A proteína é A é uma proteína da parede celular de 41kD do *Staphylococcus aureas* que se liga com alta afinidade à região Fc de anticorpos. Lindmark *et al.*, (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. A fase sólida para que a proteína A seja imobilizada é de preferência uma coluna que comprehende uma superfície de vidro ou de sílica, mais preferencialmente uma coluna de vidro com poros controlados ou uma coluna de ácido silícico. Em algumas aplicações, a coluna foi revestida com um reagente, tais como glicerol, na tentativa de evitar a aderência não específica de contaminantes.

[266] Como primeira etapa de purificação, a preparação derivada da cultura de células, conforme descrito acima, é aplicada sobre a Proteína A imobilizada em fase sólida para permitir a ligação específica do anticorpo de interesse à Proteína A. A fase sólida é então lavada para remover os contaminantes ligados de maneira não específica à fase sólida. Finalmente, o anticorpo de interesse é recuperado da fase sólida por eluição.

IMUNOCONJUGADOS

[267] A invenção também fornece imunoconjugados (designado de maneira intercambiável como “conjugado anticorpo-droga” ou “ADC”) compreendendo qualquer um dos anticorpos descritos na presente invenção conjugado a um ou mais agentes citotóxicos, tal como, por exemplo, um agente quimioterápico, um medicamento, um agente inibidor do crescimento, uma toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, vegetal, fúngica ou animal, ou fragmentos destas), ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado).

[268] O uso de conjugados anticorpo-droga para a entrega local de agentes citotóxicos ou citostáticos, ou seja, medicamentos que matam ou inibem o crescimento de células tumorais no tratamento do câncer (Syrigos e

Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz e Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; Patente US 4.975.278) permitem a entrega da fração droga aos tumores, levando ao acúmulo intracelular nestes tumores, ao passo que a administração sistêmica destes fármacos de maneira não conjugada pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade para as células normais, bem como para as células tumorais que se deseja eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* (15 de Março de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," Em: *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), págs. 475-506). Busca-se desse modo a máxima eficácia com o mínimo de toxicidade. Tanto anticorpos policlonais como anticorpos monoclonais foram relatados como úteis nessas estratégias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Os medicamentos utilizados nestes métodos incluem a daunomicina, doxorrubicina, metotrexato e vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). As toxinas usadas nos conjugados anticorpo-toxina incluem toxinas bacterianas, como a toxina da difteria, toxinas vegetais, tal como a ricina, toxinas tipo pequenas moléculas como a geldanamicina (Mandler *et al* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.*, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.*, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinóides (EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), e caliqueamicina (Lode *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.*, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). As toxinas podem empregar seus efeitos citotóxicos e citostáticos por mecanismos que incluem a ligação a tubulina, ligação ao DNA ou inibição da topoisomerase. Alguns medicamentos citotóxicos tendem a ser inativados ou se tornam menos ativos quando conjugados com grandes anticorpos ou proteínas ligantes de receptor.

[269] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) é um

conjugado anticorpo-radioisótopo composto de um anticorpo monoclonal IgG1 kappa murino direcionado contra ao antígeno CD20 encontrado na superfície de linfócitos normais e malignos, e ligado ao radioisótopo In¹¹¹ ou Y⁹⁰ por um quelante ligante tioureia (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Embora ZEVALIN tenha a atividade contra o linfoma de célula B não Hodgkin (NHL), a administração resulta em citopenias graves e prolongadas na maioria dos pacientes. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina, *Wyeth Pharmaceuticals*), um anticorpo conjugado a droga composto de um anticorpo hu CD33 ligado a caliceamicina, foi aprovado em 2000 para o tratamento da leucemia mielóide aguda por injeção (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; Patente US 4970198; US 5079233; US 5585089; US 5606040; US 5693762; US 5739116; US 5767285; US 5773001). Cantuzumab mertansina (*Immunogen, Inc.*), um conjugado anticorpo-droga composto pelo anticorpo huC242 ligado através do ligante SPP a fração maitansinóide da droga, DM1 do bissulfeto, está avançando em experimentações de fase II para o tratamento dos cânceres que expressam CanAg como, por exemplo, pancreático, gástrico entre outros. MLN-2704 (*Millennium Pharm.*, *BZL Biologics*, *Immunogen Inc.*), um conjugado anticorpo-droga composto pelo anticorpo monoclonal específico para antígeno de membrana anti-prostático (PSMA) ligado a fração maitansinóide da droga, DM1, está sob o desenvolvimento para o tratamento potencial de tumores de próstata. Os peptídeos da auristatina, auristatina E (AE) e a monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos da dolastatina, conjugado aos anticorpos monoclonais quimérico cBR96 (específico para o carcinoma de Lewis Y) e cAC10 (específico para o CD30 em malignidades hematológicas) (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) e estão sob desenvolvimento terapêutico.

[270] Os agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados são descritos no presente (acima). Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser utilizadas incluem a cadeia A da difteria, fragmentos ativos não-ligantes da toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (da *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de rícina, cadeia A da abrina, cadeia A da modeccina, alfa-sarcina, proteínas da *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas da *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor da *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor da *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Vide, por exemplo, o documento WO 93/21232 publicado em 28 de outubro de 1993. Uma série de isótopos radioativos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem Bi^{212} , I^{131} , In^{131} , Y^{90} e Re^{186} . Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(*p*-azidobenzoila)-hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos fluorados bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, uma imunotoxina ricina, conforme descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietíleno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. Vide o documento WO94/11026.

[271] Os conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de moléculas pequenas, tais como caliqueamicina, maitansinóides, dolastatinas,

aurostatinas, tricoteno e CC1065 e os derivados destas toxinas que também apresentam atividades de toxinas, são contemplados na presente invenção.

I. MAITANSINA E MAITANSINÓIDES

[272] Em alguns exemplos de realizações, o imunoconjugado compreende o anticorpo (de comprimento total ou fragmentos) da invenção conjugado a uma ou mais moléculas maitansinóides.

[273] Maitansinóides são inibidores mitóticos que agem através da inibição da polimerização de tubulina. A maitansina foi isolada pela primeira vez a partir da *Maytenus serrata* (patente US 3.896.111). Verificou-se em seguida que determinados micróbios também produzem maitansinóides, tais como maitansinol e ésteres C-3 de maitansinol (patente US 4.151.042). Maitansinol sintético, seus derivados e análogos são descritos, por exemplo, nas patentes US 4.137.230; US 4.248.870; US 4.256.746; US 4.260.608; US 4.265.814; US 4.294.757; US 4.307.016; US 4.308.268; US 4.308.269; US 4.309.428; US 4.313.946; US 4.315.929; US 4.317.821; US 4.322.348; US 4.331.598; US 4.361.650; US 4.364.866; US 4.424.219; US 4.450.254; US 4.362.663 e US 4.371.533.

[274] Frações da droga dos maitansinóides são frações atrativas da droga em conjugados anticorpo-droga porque são: (i) relativamente acessíveis para serem preparadas por fermentação ou modificação química, derivatização de produtos da fermentação, (ii) por serem receptivos à derivatização com os grupos funcionais apropriados para a conjugação através de ligações não dissulfeto aos anticorpos, (iii) são estáveis no plasma, e (iv) eficazes contra uma variedade de linhagens de células tumorais.

[275] Os imunoconjugados contendo maitansinóides e métodos para a produção dos mesmos estão descritos, por exemplo, nas patentes US 5.208.020, US 5.416.064 e patente EP 0425235 B1, cujos conteúdos são expressamente incorporados ao presente pela referência. Liu *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) descreveram imunoconjugados que compreendem um maitansinóide denominado DM1 ligado ao anticorpo monoclonal C242 dirigido o câncer colorretal humano. Foi observado que o conjugado é altamente citotóxico com relação a células cancerígenas do cólon cultivadas e exibiu atividade antitumoral em teste de crescimento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) descrevem imunoconjugados em que um maitansinóide foi conjugado por meio de uma ligação de dissulfeto ao anticorpo A7 murino que se liga a um antígeno sobre linhagens de células cancerígenas de cólon humano ou a outro anticorpo TA-1 monoclonal murino que liga o oncogene HER-2/neu. A citotoxicidade do conjugado TA.1- maitansinóide foi testado *in vitro* em células da linhagem humana SK-BR-3 de câncer de mama, que expressa 3×10^5 antígenos de superfície HER-2 por célula. O conjugado da droga conseguiu um grau de citotoxicidade similar a droga maitansinóide livre, que poderia ser aumentada pelo aumento no número de moléculas maitansinóide por a molécula de anticorpo. Os conjugados A7- maitansinóide demonstrou baixa citotoxicidade sistêmica nos camundongos.

[276] Os conjugados anticorpo-maitansinóide são preparados quimicamente ligando um anticorpo a uma molécula de maitansinóide sem diminuir significativamente a atividade biológica do anticorpo ou da molécula maitansinóide. Vide, por exemplo, a Patente US 5.208.020 (cuja divulgação é expressamente incorporada ao presente pela referência). Uma média de 3 a 4 moléculas maitansinóide conjugadas por molécula de anticorpo mostrou eficácia na amplificação da citotoxicidade em células alvo sem afetar negativamente a função ou a solubilidade do anticorpo, embora seja esperado que uma molécula de anticorpo/toxina amplifique a citotoxicidade em relação ao uso de um anticorpo nu. Maitansinóide são bem conhecidos no estado da técnica e podem ser sintetizados por técnicas conhecidas ou isolados a partir

de fontes naturais. Maitansinóide adequados são descritos, por exemplo, na patente US 5.208.020 e em outras patentes e publicações não patentárias referidas abaixo na presente invenção. Os maitansinóides preferidos são maitansinol e análogos do maitansinol modificados no anel aromático ou em outras posições da molécula de maitansinol, tais como vários ésteres do maitansinol.

[277] Existem diversos grupos de ligação conhecidos no estado da técnica para a fabricação de conjugados de anticorpo-maitansinóide, que incluem, por exemplo, os descritos na patente US 5.208.020 ou EP 0.425.235 B1 e Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) e pedido de Patente US 10/960.602, depositado em 8 de outubro de 2004, cuja divulgação é expressamente incorporada ao presente pela referência. Os conjugados anticorpo-maitansinóide contendo o componente ligante SMCC podem ser preparados conforme divulgado no pedido de Patente US 10/960602, depositado em 8 de outubro de 2004. Os grupos de ligação incluem grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos de ácidos lábeis, grupos fotolábeis, grupos lábeis de peptidase ou grupos lábeis de esterase, conforme descrito nas patentes identificadas acima, sendo os grupos dissulfeto e tioéter os preferidos. Grupos de ligação adicionais estão descritos e exemplificados no presente.

[278] Os conjugados do anticorpo e maitansinóide podem ser feitos através da utilização de uma série de agentes acopladores proteicos bifuncionais, tais com propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), cicloexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de disuccinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(para-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(para-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de

tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Os agentes acopladores particularmente preferidos incluem propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978)) e pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) (SPP) para proporcionar ligação dissulfeto.

[279] O ligante pode estar unido à molécula de maitansinóide em diversas posições, dependendo do tipo da ligação. Uma ligação éster pode ser formada, por exemplo, por meio da reação com um grupo hidroxila, utilizando-se técnicas convencionais de acoplamento. A reação pode ocorrer na posição C-3 que possui um grupo hidroxila, na posição C-14 modificada com hidroximetila, na posição C-15 modificada com um grupo hidroxila e na posição C-20 que possui um grupo hidroxila. Em uma realização preferida, a ligação é formada na posição C-3 de maitansinol ou um análogo do maitansinol.

II. AURISTATINAS E DOLOSTATINAS

[280] Em alguns exemplos de realização, o imunoconjunto compreende um anticorpo da invenção conjugado a dolastatinas ou peptídicos análogos da dolastatinas e derivados destes, e auristatinas (Patentes US 5.635.483; 5.780.588). Foi demonstrado que as dolastatinas e auristatinas interferem com a dinâmica do microtúbulo, hidrólise de GTP e divisão nuclear e celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) e possuem atividade anti-câncer (Patente US 5.663.149) e atividade antifúngica (Pettit *et al* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). A molécula de droga dolastatina ou auristatina pode ser unida covalentemente a um anticorpo através da extremidade N-terminal (amino) ou do C-terminal (carboxila) da fração peptídica da droga (documento WO 02/088172).

[281] Realizações exemplares da auristatina incluem a extremidade N-terminal ligada as frações DE e DF da droga monometilauristatina, divulgadas em “*Monomethylvaline Compounds Capable*

of Conjugation to Ligands". US 10/983,340, depositado em 5 de novembro de 2004, cuja divulgação é expressamente incorporada ao presente pela referência em sua totalidade.

[282] Tipicamente, as frações de droga baseadas em peptídeo podem ser preparadas formando uma ligação de peptídeos entre dois ou mais aminoácidos e/ou fragmentos de peptídeos. Tais ligações de peptídeos podem ser preparadas, por exemplo, de acordo com o método de síntese de fase líquida (vide, E. Schröder e K. Lübke, "The Peptides", volume 1, págs 76-136, 1965, Academic Press) que é bem conhecido no campo da química de peptídeos. As moléculas de droga auristatina/dolastatina podem ser preparadas de acordo com os métodos: das Patentes US 5.635.483; US 5.780.588; Pettit *et al* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, GR, *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; e Pettit *et al* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Vide também Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21 (7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Patente US 10/983340, depositada em 5 de Novembro de 2004, incorporado ao presente pela referência na sua totalidade (divulgando, por exemplo, ligantes e métodos de preparação de compostos monometilvalina como MMAE e MMAF conjugado aos ligantes).

III. CALIQUEAMICINA

[283] Em alguns exemplos de realizações, o imunoconjugado compreende um anticorpo da invenção conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir quebras de DNA de fita dupla em concentrações sub-picomolares. Para a preparação de conjugados da família de caliqueamicina, vide as Patentes US 5.712.374, US 5.714.586, US 5.739.116, US 5.767.285, US 5.770.701, US 5.770.710, US 5.773.001 e US 5.877.296 (todas da *American Cyanamid*

Company). Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas sem limitar-se a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG e θ_1^1 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) e as patentes US da *American Cyanamid* citadas acima). Outra droga antitumoral à qual o anticorpo pode ser conjugado é QFA, que é um antifolato. Tanto caliqueamicina quanto a QFA possuem sítios intracelulares de ação e não atravessam facilmente a membrana plasmática. Portanto, a absorção celular desses agentes através de internalização mediada por anticorpos aumenta grandemente seus efeitos citotóxicos.

IV. OUTROS AGENTES CITOTÓXICOS

[284] Outros agentes antitumorais que podem ser conjugados aos anticorpos da invenção incluem BCNU, estreptozotocina, vincristina e 5-fluorouracil, a família de agentes conhecidos coletivamente como complexo LL-E33288 descrito nas patentes US 5.053.394 e US 5.770.710, bem como as esperamicinas (Patente US 5.877.296).

[285] Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser utilizadas incluem a cadeia A da difteria, fragmentos ativos não ligantes da toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (da *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de rícina, cadeia A da abrina, cadeia A da *modeccina*, alfa-sarcina, proteínas da *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas da *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor da *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor da *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Vide, por exemplo, o documento WO 93/21232 publicado em 28 de outubro de 1993.

[286] A presente invenção contempla adicionalmente um imunoconjugado formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma endonuclease de DNA, tal como deoxirribonuclease; DNase).

[287] Para a destruição seletiva do tumor, o anticorpo pode conter um átomo altamente radioativo. Uma série de isótopos radioativos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioativos de Lu. Quando o conjugado for utilizado para diagnóstico, ele pode compreender um átomo radioativo para estudos cintigráficos, por exemplo, tc^{99m} ou I¹²³, ou um marcador de *spin* para formação de imagem através de ressonância magnética nuclear (NMR) (também conhecida como formação de imagem por ressonância magnética, MRI), tal como iodo-123, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, nitrogênio-15, oxigênio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

[288] O radiomarcador ou outros marcadores podem ser incorporados ao conjugado de formas conhecidas. O peptídeo pode ser, por exemplo, biossintetizado ou pode ser sintetizado por síntese química de aminoácidos, utilizando precursores de aminoácidos apropriados, envolvendo, por exemplo, flúor-19 no lugar de hidrogênio. Marcares como tc^{99m}, I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ podem ser ligados no peptídeo por um resíduo de cisteína. O ítrio-90 (Y⁹⁰) pode ser ligado a um resíduo de lisina. O método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) pode ser utilizado para a incorporação de iodo-123. A publicação “*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*” (Chatal, CRC Press, 1989) descreve outros métodos em detalhes.

[289] Os conjugados do anticorpo e agentes citotóxicos podem ser feitos através da utilização de uma série de agentes acopladores proteicos bifuncionais, tais com propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), cicloexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometila) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de disuccinimidila),

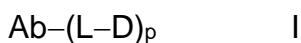
aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis-(para-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(para-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, uma imunotoxina ricina, conforme descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. Vide o documento WO94/11026. O ligante pode ser um “ligante clivável” que facilita a liberação da droga citotóxica na célula. Pode-se utilizar, por exemplo, um ligante ácido lábil, ligante sensível à peptidase, ligante fotolábel, ligante de dimetila ou ligante contendo dissulfeto (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); patente US 5.208.020).

[290] Os compostos da invenção contemplam expressamente, mas não são limitados a, ADC preparado com reagentes reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que são comercialmente disponíveis (por exemplo, pela *Pierce Biotechnology, Inc.*, Rockford, IL., EUA). Veja as páginas 467-498 de *Applications Handbook and Catalog* 2003-2004.

V. PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS ANTICORPO – DROGA

[291] Nos conjugados anticorpo – droga (ADC) da invenção, um anticorpo (Ab) é conjugado a uma ou mais frações de droga (D), por exemplo, cerca de 1 a 20 moléculas de droga por anticorpo, por meio de um ligante (L). O ADC de Fórmula I pode ser preparado por diversos protocolos, empregando reações, condições e reagentes de química orgânica conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto, incluindo: (1) a reação de um grupo nucleofílico de um

anticorpo com um reagente ligante bivalente a forma Ab-L, através de uma ligação covalente, seguida pela reação com a fração da droga D; e (2) reação de um grupo nucleofílico de uma fração da droga com um reagente ligante bivalente para formar D-L, através de uma ligação covalente, seguida pela reação com o grupo nucleofílico de um anticorpo. Métodos adicionais para preparação de ADC estão descritos no presente.



[292] O ligante pode ser composto por um ou mais componentes ligante. Exemplos componentes de ligantes incluem 6-maleimidocaproil (“CM”), maleimidopropanoil (“MP”), valina-citrulina (“val-cit”), alanina-fenilalanina (“ala-fen”), p-aminobenziloxicarbonil (“PAB”), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (“SPP”), N-Succinimidol 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (“SMCC”), e Succinimidil N-(4-iodo-acetil) aminobenzoato (“SIAB”). Componentes ligantes adicionais são conhecidos no estado da técnica e alguns estão descritos no presente documento. Vide também “*Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands*”, US Nº 10/983340, depositado em 5 de Novembro de 2004, cujo conteúdo é incorporado ao presente pela referência em sua totalidade.

[293] Em alguns exemplos de realização, o ligante pode compreender resíduos de aminoácidos. Exemplos de componentes ligantes de aminoácidos incluem dipeptídeos, tripeptídeos, tetrapeptídeos ou pentapeptídeos. Dipeptídeos exemplares incluem: valina-citrulina (vc ou val-cit), fenilalanina-alanina (af ou ala-fen). Tripeptídeos exemplares incluem: glicina-valina-citrulina (gli-val-cit) e glicina-glicina-glicina (gli-gli-gli). Resíduos de aminoácidos que compreendem um componente aminoácido ligante incluem aqueles que ocorrem naturalmente, bem como aminoácidos menores e aminoácidos análogos de ocorrência não natural, como a citrulina. Componentes ligantes de aminoácidos podem ser concebidos e otimizados em

sua seletividade para a clivagem enzimática por meio de enzimas específicas, por exemplo, uma protease associada ao tumor, antígenocat B, C e D, ou uma protease plasmina.

[294] Grupos nucleofílicos em anticorpos incluem, mas não estão limitados a: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amina da cadeia lateral, por exemplo, lisina, (iii) grupos tióis de cadeia lateral, por exemplo, de cisteína, e (iv) grupos açúcares hidroxila ou amino, em que o anticorpo está glicosilado. Grupos amina, tiol e hidroxila são nucleofílicos e são capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos eletrofílicos nas frações ligantes e reagentes ligantes, incluindo: (i) ésteres de ativos, tais como ésteres NHS, ésteres HOBr, haloformatos e ácidos halogenetos, (ii) haletos de alquila e benzila como haloacetamidas, (iii) aldeídos, cetonas, carboxila e grupos maleimida. Certos anticorpos possuem dissulfetos intercadeias redutíveis, ou seja, pontes de cisteína. Os anticorpos podem ser reativos para a conjugação com os reagentes ligantes pelo tratamento com um agente redutor, como o DTT (ditiotreitol). Cada ponte de cisteína forma, teoricamente, dois tióis nucleofílicos reativos. Grupos nucleofílicos adicionais podem ser introduzidos em anticorpos por meio da reação das lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut), resultando na conversão de uma amina em um tiol. Os grupos tióis reativos podem ser introduzidos no anticorpo pela introdução de um, dois, três, quatro ou mais resíduos de cisteína (por exemplo, preparando anticorpos mutantes compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido cisteína não nativos).

[295] O conjugado anticorpo-droga da presente invenção pode também ser produzido pela modificação do anticorpo para introduzir porções eletrofílicas, que podem reagir com substituintes nucleofílicos no reagente ligante ou droga. Os açúcares dos anticorpos glicosilados podem ser oxidados, por exemplo, com reagentes periodato oxidantes, formando grupos aldeído ou

cetona que podem reagir com o grupo amina do reagente ligante ou molécula de droga. Os grupos de base de Schiff imina resultantes podem formar uma ligação estável, ou podem ser reduzidos, por exemplo, por meio de reagentes borohidreto para formar ligações amina estáveis. Em um exemplo de realização, a reação da porção carboidrato de um anticorpo glicosilado com qualquer glactose oxidase ou meta-periodato de sódio pode resultar em grupos carbonila (aldeído e cetona) na proteína que pode reagir com grupos apropriados na droga (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). Em outro exemplo de realização, as proteínas contendo resíduos de serina ou treonina N-terminal podem reagir com o meta-periodato de sódio, resultando na produção de um aldeído no lugar do primeiro aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; Patente US 5.362.852). Tal aldeído pode reagir com uma molécula de droga ou ligante nucleofílico.

[296] Da mesma forma, grupos nucleofílicos na molécula de droga incluem, mas não estão limitados a: Grupos amina, tiol, hidroxila, hidrazida, oxima, tiosemicarbazona hidrazina, carboxilato hidrazina, e arilhidrazida capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos eletrofílicos na frações ligante e reagentes ligante, incluindo: (i) ésteres de ativos, tais como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos e ácidos halogenetos, (ii) haletos de alquila e benzila como haloacetamidas, (iii) aldeídos, cetonas, carboxila e grupos maleimida.

[297] Alternativamente, pode ser feita uma fusão proteica compreendendo o anticorpo e o agente citotóxico, por exemplo, por técnicas recombinantes ou pela síntese de peptídeos. O comprimento de DNA pode conter regiões respectivas que codificam as duas porções do conjugado adjacentes ou separadas por uma região que codifica um peptídeo ligante que não destrua as propriedades desejadas do conjugado.

[298] Ainda em outra realização, o anticorpo pode ser conjugado a

um “receptor” (tal como estreptavidina) para a utilização no pré-direcionamento tumoral, em que o conjugado de anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção do conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de limpeza e, em seguida, um “ligante” (por exemplo, a avidina) que está conjugado a um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo) é administrado.

FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

[299] As formulações terapêuticas dos polipeptídeos heterólogos são preparadas para o armazenamento misturando o polipeptídeo heterólogo possuindo o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizantes opcionais fisiológicamente aceitáveis (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de soluções aquosas, liofilizada ou outras formulações secas. Os veículos, excipientes e estabilizantes aceitáveis são atóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, histidina e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do 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 a glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açucares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal tal como sódio; complexos metálicos (tal como, complexos Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos tais

como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG).

[300] A presente formulação também pode conter mais de um composto ativo de acordo com a necessidade para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não prejudique um ao outro. Tais moléculas estão adequadamente presentes na combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

[301] Os ingredientes ativos podem também ser armazenados em microcápsula preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por meio de polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsula de gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a Edição, Osol, A. Ed. (1980).

[302] As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido por meio da filtragem através de membranas de filtragem estéreis.

[303] Podem ser fabricadas preparações de liberação controlada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o anticorpo, que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como poli-(metacrilato de 2-hidroxietila) ou álcool poli-(vinílico)), poli-lactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ L-glutamato de etila, acetato de etilenovinila não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tal como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e

ácido glicólico e acetato de leuprolide) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora polímeros tais como etilenovinilacetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo por um longo período, eles podem desnaturar ou se agregarem como resultado da exposição à umidade a 37 °C, resultando na perda da atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para a estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se é verificado que mecanismo de agregação é a formação de pontes S-S intermoleculares através do intercâmbio tio-dissulfeto, a estabilização pode ser obtida pela modificação de resíduos sufidrila, liofilização de soluções ácidas, controlando o conteúdo de umidade, utilizando aditivos adequados e desenvolvendo composições de matriz polimérica específicas.

Usos

[304] Um polipeptídeo heterólogo da presente invenção pode ser utilizado, por exemplo, para purificar, detectar e direcionar um polipeptídeo específico que ele reconhece, incluindo o diagnóstico *in vitro* e *in vivo* e métodos terapêuticos.

[305] Em um aspecto, um anticorpo da invenção pode ser utilizado em imunoensaios para mensurar qualitativamente e quantitativamente抗ígenos específicos em amostras biológicas. Os métodos convencionais para a detecção da ligação抗ígeno-anticorpo inclui, por exemplo, um ensaio ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA), um radioimunoensaio (RIA) ou imunohistoquímica em tecido. Muitos métodos podem utilizar um marcador (*label*) ligado ao anticorpo para fins de detecção. O marcador usado com o anticorpo é de qualquer funcionalidade detectável que não interfira com a sua ligação ao anticorpo. Diversos marcadores são conhecidos, incluindo os

radioisótopos P^{32} , S^{32} , C^{14} , I^{125} , H^3 , e I^{131} , fluoróforos tais como quelatos terrosos raros ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansil, umbeliferona, luceriferases, por exemplo, a luciferase do vaga-lume e luciferase bacteriana (Patente US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidase de rábano silvestre (HRP), fosfatase alcalina, p-galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases, por exemplo, glicose oxidase, galactose oxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase, oxidases heterocíclicas como uricase e xantina-oxidase, lactoperoxidase, biotina/avidina, marcadores de *spin*, marcadores de bacteriófagos, radicais livres estáveis, radionuclídeos usados na imagiologia (tal como tecnécio) e similares.

[306] Estão disponíveis métodos convencionais para a ligação destes marcadores por meios covalentes aos polipeptídeos heterólogos. Por exemplo, agentes de acoplamento tais como dialdeídos e carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, benzidina bis-diazotizada, e similares podem ser usados para marcar os anticorpos com os marcadores fluorescentes, quimioluminescentes e enzimáticos descritos acima. Vide, por exemplo, a Patente US 3.940.475 (fluorimetria) e Patente US 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.* *Nature* 144: 945 (1962); David *et al.* *Biochemistry* 13:1014-1021 (1974); Pain *et al.* *J. Immunol. Methods* 40:219-230 (1981); e Nygren *Histochem. and Cytochem* 30:407-412 (1982). Os marcaodres preferidos na presente invenção são enzimas tais como a peroxidase de rábano silvestre (HRP) e fosfatase alcalina. A conjugação de tal marcador, incluindo as enzimas, para o polipeptídeo anticorpo é um procedimento de manipulação padrão para um técnico perito nas técnicas de imunoensaio. Vide, por exemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay" em: *Methods in Enzymology*, Ed. J. J. Langone & H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nova Iorque, N.Y., 1981), págs. 147-

166. Tais métodos de ligação são adequados para a utilização com os polipeptídeos heterólogos da presente invenção.

[307] Uma alternativa para a marcação de polipeptídeos heterólogos, é o uso de um ensaio que pode avaliar um antígeno em fluídos biológicos por um imunoensaio competitivo utilizando um antígeno de competição padrão marcado com uma substância detectável e um polipeptídeo heterólogo não marcado. Neste ensaio, a amostra biológica, os padrões de antígeno marcado e o polipeptídeo heterólogo são combinados e a quantidade de antígeno padrão marcado ligado ao polipeptídeo heterólogo não marcado é determinada. A quantidade de antígeno testado na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de antígeno padrão marcado ligado ao polipeptídeo heterólogo.

[308] Em um aspecto, um polipeptídeo heterólogo (tal como um anticorpo) da invenção é particularmente útil para detectar de maneira *in vitro* ou *in vivo* o perfil de expressões de抗ígenos de superfície específicos. Conforme discutido anteriormente, em geral, um anticorpo aglicosilado não exerce as funções efetoras (isto é, atividade ADCC ou CDC). Portanto, quando o anticorpo se liga ao antígeno da superfície celular, ele não irá iniciar eventos citotóxicos indesejáveis. O antígeno de superfície pode ser específico para um tipo de célula ou tecido, portanto, serve como um marcador do celular ou tecido. Preferencialmente, o antígeno de superfície marcador é expresso diferencialmente em diversas fases de diferenciação de tipos celulares ou de tecidos específicos. O anticorpo direcionado contra o antígeno de superfície pode, dessa forma, ser utilizado para a triagem de populações de células ou tecido que expressam o marcador. Por exemplo, o anticorpo da invenção pode ser utilizado para a triagem e isolamento de células-tronco, tal como células-tronco embrionárias, células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais. O anticorpo da invenção também pode ser usado para detectar

células tumorais que expressão antígenos de superfície associados a tumores, tais como receptores de c-met, HER2, HER3 ou Her4.

[309] Um anticorpo ou outro polipeptídeo heterólogo da invenção pode ser utilizado como um agente de purificação por afinidade. Neste processo, o polipeptídeo está imobilizado sobre uma fase sólida, tal como uma resina Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos no estado da técnica. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, tal como tampão glicina, pH 5,0, que libertará o antígeno a partir do polipeptídeo.

[310] Em um aspecto, a invenção fornece usos de um polipeptídeo heterólogo gerado utilizando os métodos da invenção, na preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico e/ou profilático de uma doença, tal como um câncer, tumor, distúrbio proliferativo celular, e/ou um distúrbio imune (tal como autoimune). O polipeptídeo heterólogo pode estar em qualquer forma descrita no presente, incluindo o anticorpo, fragmento do anticorpo, polipeptídeo (por exemplo, um oligopeptídeo), ou combinação dos mesmos. Em alguns exemplos de realização, o antígeno é uma molécula de proteína humana e o sujeito (paciente) é um sujeito humano.

[311] Os polipeptídeos heterólogos da invenção podem ser utilizados para diagnosticar, tratar, inibir ou prevenir doenças, distúrbios ou condições associadas com a expressão e/ou atividade anormal de uma ou mais moléculas de antígeno, incluindo, mas não se limitando a tumores malignos e benignos, não leucemias e malignidades linfoides; distúrbios neuronais, gliais, astrocitais, do hipotálamo e de outras glândulas, macrofágico, de células epiteliais, distúrbios estromais e blastocoélicos, e distúrbios inflamatórios, angiogênicos e imunológicos.

[312] Em determinados exemplos de realização, um imunoconjunto compreendendo o anticorpo é administrado ao paciente.

Preferencialmente, o imunoconjunto e/ou antígeno ao qual ele está ligado é/são internalizado(s) pelas células.

[313] Os polipeptídeos heterólogos da presente invenção podem ser usados sozinhos ou em combinação com outras composições em uma terapia. Por exemplo, o polipeptídeo heterólogo pode ser coadministrado com um anticorpo, agente(s) quimioterápico(s) (incluindo coquetéis de agentes quimioterápicos), outro(s) agente(s) citotóxico(s), agente(s) anti-angiogênicos, citoquinas, e/ou agente(s) inibidor(es) do crescimento. Quando o polipeptídeo heterólogo inibe o crescimento do tumor, pode ser particularmente desejável combinar o polipeptídeo heterólogo com um ou mais agente(s) terapêutico(s) diferente(s) que também inibe(m) o crescimento tumoral. Alternativamente, ou adicionalmente, o paciente pode receber radioterapia combinada (por exemplo, irradiação com feixe externo ou terapia com um agente radioativamente marcado, tal como um anticorpo). Esta terapia combinada referida acima inclui a administração combinada (onde dois ou mais agentes estão incluídos na mesma formulação ou em formulações distintas), e a administração separada, e nesse caso, a administração do anticorpo pode ocorrer antes, e/ou após a administração da(s) terapia(s) adjunta(s).

[314] O polipeptídeo heterólogo (e opcionalmente um agente terapêutico adjunto) é/são administrado(s) por qualquer meio adequado, incluindo a via parenteral, subcutânea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal e, se desejado para tratamento local, a administração intralesional. As infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Além disso, o anticorpo é administrado adequadamente por meio de infusão pulsada, particularmente com doses decrescentes do anticorpo. Preferencialmente a dosagem é dada por injeções, mais preferencialmente por injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo, em parte, se a administração é breve ou crônica.

[315] A composição de polipeptídeos heterólogos da invenção será formulada, dosada, e administrada de forma consistente com a boa prática médica. Fatores que devem ser considerados neste contexto incluem o distúrbio específico a ser tratado, a mamífero específico a ser tratado, a condição clínica do paciente, a causa do distúrbio, o local de entrega do agente, o método de administração, o esquema de administração e outros fatores conhecidos pelos médicos. O anticorpo não precisa ser, mas opcionalmente é formulado com um ou mais agentes atualmente utilizados para prevenir ou tratar os distúrbios em questão. A quantidade eficaz de tais outros agentes depende da quantidade de anticorpo presente na formulação, o tipo de distúrbio ou tratamento, e outros fatores discutidos anteriormente. Estes são geralmente utilizados na mesma dosagem e com as vias de administração utilizadas conforme mencionado anteriormente ou cerca de 1 a 99% das dosagens até então empregadas.

[316] Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada do anticorpo (quando utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes, tais como agentes quimioterápicos) dependerá do tipo de doença a ser tratado, do tipo de anticorpo, da severidade e do curso da doença, se o anticorpo é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, se houve e qual foi a terapia anterior, do histórico clínico do paciente e a resposta ao anticorpo, e do critério do médico atendente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente em uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e da severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por exemplo 0,1mg/kg–10mg/kg) de anticorpo é uma dose inicial candidata para a administração ao paciente, seja, por exemplo, por meio de uma ou mais administrações separadas ou por meio de infusão contínua. Para as administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra a

supressão pretendida dos sintomas da doença. A dosagem preferida do anticorpo estará na faixa de cerca de 0,05mg/kg a cerca de 10mg/kg. Pode ser administrada uma dose de ataque inicial mais alta, seguida por uma ou mais doses mais baixas. Entretanto, outros regimes de dosagens podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por meio de técnicas e ensaios convencionais.

ARTIGOS MANUFATURADOS

[317] Em outro exemplo de realização da invenção, um artigo manufaturado que contém materiais úteis para o tratamento, prevenção e/ou diagnóstico dos distúrbios descritos anteriormente é fornecido. O artigo manufaturado compreende um recipiente e um rótulo ou bula sobre o recipiente ou associado a ele. Recipientes apropriados incluem, por exemplo, garrafas, ampolas (*vials*), seringas etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é eficaz para o tratamento da condição e pode ter uma porta de acesso estéril (o recipiente pode ser, por exemplo, uma bolsa de solução intravenosa ou uma ampola que contém uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo da presente invenção. O rótulo ou bula indica que a composição é utilizada para o tratamento da condição de escolha, como o câncer. Além disso, o artigo manufaturado pode compreender (a) um primeiro recipiente com uma composição ali contida, em que a composição compreende um anticorpo, e (b) um segundo recipiente com uma composição ali contida, em que a composição compreende um agente citotóxico adicional. O artigo de manufatura neste exemplo de realização pode ainda compreender uma bula indicando que a primeiro e segunda composição de anticorpos podem ser usadas para tratar o câncer. Alternativamente ou adicionalmente, o artigo manufaturado pode compreender ainda um segundo (ou terceiro) recipiente

que compreende um tampão farmaceuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode incluir adicionalmente outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

[318] Os exemplos a seguir visam apenas ilustrar a prática da presente invenção e não são fornecidos com o objetivo de limitar de maneira alguma a invenção. As divulgações de todas as patentes e literaturas científicas citadas no presente são expressamente e integralmente incorporadas pela referência.

EXEMPLOS

MATERIAIS E MÉTODOS

[319] *Cepas bacterianas e meios* - As cepas e plasmídeos utilizados no presente estudo estão listados na Tabela 1. Para os frascos de cultura de agitação, todas as cepas foram cultivadas em meio Lauria-Bertani (LB) ou meio limitante de fosfato “CRAP” (1) a 30 ou 37 °C conforme indicado. Meio do fermentador foi essencialmente como descrito na referência 1. Os antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: 50 µg/ml de carbenicilina, 50 µg/ml de canamicina, 12,5 µg/ml de cloranfenicol, ou 20 ug/ml de tetraciclina.

[320] *Construção e avaliação de bibliotecas TIR relativas* – Os peptídeos-sinal da enterotoxina II estável ao calor (STII), proteína periplasmática de ligação a maltose (MalE), fosfatase alcalina (PhoA), ou proteína de intercâmbio tiol:bissulfeto (DsbA) foram amplificados por PCR e fundidos ao domínio maduro do gene *phoA* utilizando primers degenerados que introduziram códons com mutações silenciosas “wobble-based” (“wobble-based”, quando a terceira base de cada códon é oscilante) (2) durante os seis primeiros aminoácidos após o códon de iniciação do gene parental com nove

pares de base (pb) de sítios de restrição *BssHII*, *MluI* ou *XbaI* a montante do dito códon de iniciação (vide Tabela 2). Os DNAs codificantes dos códons tipo selvagem de cada sequência sinal também foram gerados. Estas inserções foram então rotineiramente clonadas nos sítios *Spel/NotI* (New England Biolabs) do plasmídeo pPho41 (3) e transformadas em células JM109 competentes (Promega), recuperadas durante uma hora e subcultivadas em 200 ml de meio LB suplementado com cabenicilina a 37 °C durante dezesseis horas e, subsequentemente submetida a preparação com o kit “*maxi-prepped*” (Qiagen). Uma alíquota de células recuperadas de cada biblioteca foi plaqueada em placas de ágar LB seletivas, a fim de determinar o tamanho da biblioteca; todas as bibliotecas produziram uma cobertura entre ~ 10-100x sobre todos os tamanhos teóricos de biblioteca. O DNA purificado foi então transformado em células 27C7 competentes e as células foram plaqueadas em placas de agar LB suplementado com carbenicilina e 100 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP; Sigma) e cultivadas a 37 °C durante dezesseis horas. As colônias que apareceram com coloração azul claro indicavam supostamente que carregavam uma variante da TIR exibindo pelo menos um baixo nível de atividade PhoA, enquanto as colônias azul escuras eram indicativas de células que abrigam fortes variantes da TIR (4), e as colônias brancas eram supostamente células que carregavam variantes da TIR com pouco ou nenhuma expressão da PhoA; a percentagem de colônias azuis sobre uma dada placa de ágar variou em ~ 2-70%. O DNA a partir de colônias individuais exibindo matiz variantes de azul foi preparado com o kit “*miniprepped*” (Qiagen), sequenciado pela Análise SRS (Genentech, Inc.), e retransformado em células 27C7 competentes e, em seguida, testados quanto a atividade basal do *phoA* conforme descrito anteriormente (3). Resumidamente, as colônias foram cultivadas em meio LB seletivo a 30 °C durante dezesseis horas, diluídas 1:100 em meio fresco e cultivadas durante

um período adicional de quatro horas a 30 °C. As culturas foram então normalizadas com base na densidade óptica (OD₅₅₀) e ressuspensas em meio AP-estrito (3), em seguida, armazenadas a -20 °C durante a noite. As células foram posteriormente descongeladas, permeabilizadas parcialmente pelo tratamento com tolueno (Sigma) (5) e aeradas a 37 °C durante uma hora. Quarenta microlitros de cada cultura foram adicionados a uma solução contendo 1 mM de hexaidrato de 4-nitrofenil fosfato dissódico (PNPP; Promega) em 1 M de Tris-HCl (pH 8,0) e incubados no escuro em temperatura ambiente durante uma hora. As reações foram paradas com a adição de 100 µL de tampão fosfato de sódio (pH 6,5) e a absorbância a 410 nm (A₄₁₀) foi lida em uma prazo de 20 minutos. As forças das TIRs relativas foram calculadas primeiro subtraindo a partir de cada A₄₁₀ da amostra a absorbância de fundo (*background*) a partir de uma cultura contendo um vetor vazio (pBR322) e, em seguida, dividindo pela absorbância corrigida a partir de uma cultura carregando o plasmídeo pPho41. Todos os valores TIR relatados são resultados de, pelo menos, sete experimentos em replicatas.

[321] *Construção de vetores de expressão de anticorpos* – Os peptídeos sinal foram rotineiramente clonados no sistema de dois *cistrons* anteriormente descrito (1). Os variantes do peptídeo sinal de cadeia pesada foram criados pela fusão do peptídeo sinal de interesse através da amplificação mutagênica por PCR com iniciadores sobrepostos (*splicing overlap extension* (SOE-PCR)) para a cadeia pesada de interesse e clonado em sítios *BssHII/HpaI* (New England Biolabs). Os variantes do peptídeo sinal da cadeia leve foram feitos de forma semelhante utilizando a técnica de SOE-PCR e clonando em sítios *MluI/PacI* (New England Biolabs) ou *XbaI/PacI* (New England Biolabs) conforme especificado pela sequência de nucleotídeos TIR variante individual (Tabela 2). Todas as sequências das construções foram confirmadas pela Análise SRS (Genentech, Inc).

[322] *Indução e análise em pequena escala* - As células foram cultivadas em 5 mL de meio LB suplementado com fosfato de sódio 5 mM (pH 7,0) a 30 °C durante 16 horas. Uma alíquota de 500 µL de células foi então usada para inocular 25 mL de meio seletivo limitante de fosfato CRAP e as células foram cultivadas durante 24 horas a 30 °C. Onde indicado, as células carregando o plasmídeo pJJ247 foram induzidas com isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) para uma concentração final de 1,0 mM, quando as células atingiram uma OD₆₀₀ ~ 2,0. No *end-point* as amostras de caldo total foram obtidas e diluídas a uma OD₆₀₀ ~ 3,0 em tampão de lise (10 mM Tris pH 6,8, EDTA 5 mM, 0,2 mg/mL de lisozima (Sigma), 5 mM de ácido iodoacético (Sigma)) e incubadas em gelo durante 10 minutos. As amostras foram sonicadas, centrifugadas para remover os detritos celulares e depois analisadas utilizando a análise de SDS-PAGE (10% Bis-Tris, Invitrogen). As amostras dos lisados de células inteiras foram normalizadas pelas densidades ópticas equivalentes reduzidas com 0,2 M de ditiotreitol (DTT, Sigma), e analisadas utilizando a análise SDS-PAGE. Todos as pistas do gel foram carregadas com volumes equivalentes de amostras e sondadas utilizando um anticorpo humano anti-Fc (*Southern Biotech*) em uma diluição 1:200.000 ou um anticorpo de rato anti-κLc (*Southern Biotech*) em uma diluição de 1:200.000. Todos os anticorpos foram conjugado com HRP e submetidas a *imunoblots* utilizando Western Lightning-ECL (PerkinElmer) e expondo a membrana ao filme *Biomax XAR Film* (Kodak). As amostras de proteína também foram analisadas pela coloração com azul de Coomassie seguindo as técnicas padrão.

[323] *Indução em larga escala* - As fermentações foram realizadas conforme descrito anteriormente (1). Resumidamente, uma alíquota de 500 µL de células criopreservadas a partir de uma cultura em meio LB seletivo de 5 mL foi usada para inocular 500 mL de meio LB

seletivo e o cultivo foi realizado a 30 °C durante 16 horas. Um fermentador de 10 L foi então inoculado (essencialmente conforme descrito na ref. 1) e as células foram crescidas até uma densidade elevada, utilizando um algoritmo baseado em computador para alimentar uma solução de glicose concentrada baseada na demanda da fermentação. Onde indicado, as células carregando o plasmídeo pJJ247 foram induzidas com isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) para uma concentração final de 1,0 mM, quando as células atingiram uma OD₆₀₀ ~ 200. O caldo completo e as amostras normalizadas a uma OD₅₅₀ foram coletados em intervalos de tempo regulares e todas as fermentações foram terminadas após 2-3 dias. A aptidão da cultura foi rotineiramente monitorada pelo uso de parâmetros *online* e *offline*. As amostras foram analisadas usando a análise por SDS-PAGE conforme descrito acima.

[324] *Análise das amostras por HPLC* – As amostras de qualquer um dos experimentos de indução em pequena ou grande escala foram analisadas para concentrações da cadeia total (insolúveis e solúveis) pesada ou leve através de uma técnica previamente desenvolvida usando a análise HPLC de fase reversa (Lisa Wong, comunicação pessoal). As amostras foram analisadas para espécies de anticorpo contendo cadeia leve por uma dupla coluna de fase reversa em Proteína L baseada na análise por HPLC (operações analíticas, Genentech, Inc.). Os títulos de anticorpos foram obtidos pela comparação das áreas de pico do cromatograma por uma curva padrão gerada pela adição de amostras em branco com quantidades conhecidas das moléculas de interesse.

TABELA 1

CEPAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO

Cepa ou Plasmídeo	Genótipo/fenótipo relevante	Referência ou fonte
Cepas de <i>E. coli</i>		
27C7	Δ <i>fhuA</i> (Δ <i>tonA</i>) <i>phoA</i> Δ <i>E15</i> Δ(<i>argF-lac</i>)169 <i>ptr3</i> <i>degP41</i> kan ^R <i>ompT</i> Δ(<i>nmpc-fepE</i>)	(3)

Cepa ou Plasmídeo	Genótipo/fenótipo relevante	Referência ou fonte
64B4	W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG+ \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^q \Delta ompT$	Estoque do laboratório
JM109	e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK ^r mK ^r) supE44 relA1 $\Delta(lac-proAB)$ [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]	Promega
Plasmídeos		
pPho41	Cb ^r	(3)
pBR322	Cb ^r , Tc ^r	Estoque do laboratório
ph5D5	Anticorpo 5D5 Humanizado (indiferentemente denominado de anticorpo 5D5.v2) clonado em um pBR322	Estoque do laboratório'
pJJ247	<i>E. coli</i> dsbA e dsbC sob controle do promotor tac em um vetor derivado do pACYC, Km ^r	Estoque do laboratório
pBR-STIIHc1.0-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIIHc2.41-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIIHc3.38-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIIHc4.60-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.4 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIIHc5.34-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.5 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIIHc6.52-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.6 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIIHc8.36-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssSTII TIRv.8 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIILc1.0-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssSTII TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIILc2.74-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssSTII TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-STIILc3.72-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssSTII TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbAHc1.48-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssDsbA TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbAHc2.WT-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssDsbA TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbAHc3.79-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssDsbA TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbAHc7.72-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssDsbA TIRv.7 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbALc1.WT-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssDsbA TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbALc2.3-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssDsbA TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-DsbALc3.37-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssDsbA TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo

Cepa ou Plasmídeo	Genótipo/fenótipo relevante	Referência ou fonte
pBR-PhoAHc1.70-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAHc2.64-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAHc3.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAHc4.67-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.4 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAHc5.71-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.5 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAHc6.77-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.6 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoALc1.104-PhoA	<i>E. coli</i> <i>MluI</i> -ssPhoA TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb2.41-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb3.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb5.53-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.5 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb6.15-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.6 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb7.1-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.7 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb8.24-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.8 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-PhoAXb10.23-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.10 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEHc1.92-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssMalE TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEHc2.100-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssMalE TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalELc1.97-PhoA	<i>E. coli</i> <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalELc2.123-PhoA	<i>E. coli</i> <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb1.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.1 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb2.15-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.2 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb3.12-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.3 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb5.37-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.5 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb6.4-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.6 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb7.25-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.7 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo

Cepa ou Plasmídeo	Genótipo/fenótipo relevante	Referência ou fonte
pBR-MalEXb8.13-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Xba</i> I-ssMalE TIRv.8 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-MalEXb11.34-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Xba</i> I-ssMalE TIRv.11 fundido ao Δ(1-22)PhoA em pPho41	Este estudo
pBR-SS-5D5-1.1	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SS-5D5-1.2	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SS-5D5-2.1	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SS-5D5-2.2	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SM-5D5-1.1	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SM-5D5-1.2	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MalE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SM-5D5-2.1	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SM-5D5-2.2	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MalE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SD-5D5-1.1	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SD-5D5-1.2	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SD-5D5-2.1	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SD-5D5-2.2	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SP-5D5-1.1	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SP-5D5-1.2	STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SP-5D5-2.1	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-SP-5D5-2.2	STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MS-5D5-1.1	MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MS-5D5-1.2	MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MS-5D5-2.1	MalE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MS-5D5-2.2	MalE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MM-5D5-1.1	MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MM-5D5-1.2	MalE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MalE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo

Cepa ou Plasmídeo	Genótipo/fenótipo relevante	Referência ou fonte
pBR-MM-5D5-2.1	MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MM-5D5-2.2	MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MD-5D5-1.1	MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MD-5D5-1.2	MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MD-5D5-2.1	MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MD-5D5-2.2	MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MP-5D5-1.1	MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MP-5D5-1.2	MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MP-5D5-2.1	MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-MP-5D5-2.2	MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DS-5D5-1.1	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DS-5D5-1.2	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DS-5D5-2.1	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DS-5D5-2.2	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DM-5D5-1.1	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DM-5D5-1.2	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DM-5D5-2.1	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DM-5D5-2.2	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DD-5D5-1.1	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DD-5D5-1.2	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DD-5D5-2.1	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DD-5D5-2.2	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DP-5D5-1.1	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DP-5D5-1.2	DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo

Cepa ou Plasmídeo	Genótipo/fenótipo relevante	Referência ou fonte
pBR-DP-5D5-2.1	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-DP-5D5-2.2	DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PS-5D5-1.1	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PS-5D5-1.2	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PS-5D5-2.1	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PS-5D5-2.2	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, STII TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PM-5D5-1.1	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PM-5D5-1.2	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PM-5D5-2.1	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PM-5D5-2.2	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, MaIE TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PD-5D5-1.1	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PD-5D5-1.2	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PD-5D5-2.1	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PD-5D5-2.2	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PP-5D5-1.1	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PP-5D5-1.2	PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PP-5D5-2.1	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo
pBR-PP-5D5-2.2	PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Hc, PhoA TIRv.2 fundido ao 5D5 Lc	Este estudo

Hc = cadeia pesada

Lc= cadeia leve

5D5 = anticorpo monoclonal anti-c-met clone 5D5. v2. As sequências da cadeia pesada e leve do 5D5.v2 são mostradas na Figura 7 e também estão descritas, por exemplo, no documento WO2006/015371; e Jin *et al*, *Cancer Res.* (2008) 68:4360.

TABELA 2
SEQUÊNCIAS-SINAL VARIANTES

[325] **Negrito e itálico** = sequência que foram variadas (ou seja, nos primeiros seis aminoácidos após o códon de iniciação)

[326] **Itálico** = sítios de restrição *BssHII*, *MluI*, ou *XbaI*

Gen e Parental	Clon e ID	Genótipo/Fenótipo Relevante	Força da TIR Relativa	SEQ ID N:O:
<i>stl1</i>	SH1.2	GCGCGCATTATG <i>AAGAAAAAACATCGCTTT</i> CTTCTTGCATCTATGTTGTTTTCTATT GCTACAAACGCTTACGCT	0,99 ± 0,07	1
	SH2.41	GCGCGCATTATG <i>AAAAAAAATATAGCGTT</i> <i>TCTTCTTGCATCTATGTTGTTTTCTA</i> TTGCTACAAACGCTTACGCT	1,94 ± 0,05	2
	SH3.38	GCGCGCATTATG <i>AAAAAAAACATTGCCTTC</i> TTCTTGCATCTATGTTGTTTTCTATTGC TACAAACGCTTACGCT	2,9 ± 0,2	3
	SH4.60	GCGCGCATTATG <i>AAAAAGAACATTGCCTT</i> CTTCTTGCATCTATGTTGTTTTCTATT GCTACAAACGCTTACGCT	4,1 ± 0,1	4
	SH5.34	GCGCGCATTATG <i>AAGAAAAATATTGCATT</i> CTTCTTGCATCTATGTTGTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT	5,0 ± 0,2	5
	SH6.52	GCGCGCATTATG <i>AAAAAAAATATTGCATT</i> CTTCTTGCATCTATGTTG TTTTTCTATTGCTACAAACGCTTACGCT	5,9 ± 0,2	6
	SH8.36	GCGCGCATTATG <i>AAAAAAAATATTGCTTT</i> CTTCTTGCATCTATGTTG TTTTTCTATTGCTACAAACGCTTACGCT	7,7 ± 0,1	7
	SL1.2	ACGCGTATTATG <i>AAGAAAAACATCGCTTT</i> CTTCTTGCATCTATGTTG TTTTTCTATTGCTACAAACGCTTACGCT	0,75 ± 0,07	8
	SL2.74	ACGCGTATTATG <i>AAAAAGAACATTGCCTT</i> CTTCTTGCATCTATGTTG TTTTTCTATTGCTACAAACGCTTACGCT	1,9 ± 0,2	9

Gene Parental	Clone ID	Genótipo/Fenótipo Relevante	Força da TIR Relativa	SEQ ID N:O:
	SL3.72	ACGCGTATTATGAAAAAAAATTTGCTTTCTTCTGCATCTATGTTCG TTTTTCTATTGCTACAAACGCTTACGCT	2,9 ± 0,2	10
mal E	MH1.92	GCGCGCATTATGAAAATTAAGACTGGAGCACGCATCCTCGCATTATC CGCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	1,1 ± 0,1	11
	MH2.100	GCGCGCATTATGAAAGATAAAACCGGGAGCCCGCATCCTCGCATTATC CGCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	1,9 ± 0,1	12
	ML1.97	ACGCGTATTATGAAAGATCAAGACAGGGCGCGCATCCTCGCATTATC CGCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	1,1 ± 0,1	13
	ML2.123	ACGCGTATTATGAAAGATCAAGACAGGGGCCCGCATCCTCGCATTATC CGCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	2,0 ± 0,1	14
	MX1.wt	TCTAGAATTATGAAAATAAAAACAGGTGCAACGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	1,1 ± 0,1	15
	MX2.15	TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGGCGCGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	2,0 ± 0,1	16
	MX3.12	TCTAGAATTATGAAAATCAAAACCGGGCGCTCGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	3,01 ± 0,09	17
	MX5.37	TCTAGAATTATGAAAGATCAAGACTGGAGCTCGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	5,0 ± 0,2	18
	MX6.4	TCTAGAATTATGAAAATAAAGACGGGAGCTCGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	5,8 ± 0,3	19
	MX7.25	TCTAGAATTATGAAAGATAAAGACTGGTGCAGCGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	7,1 ± 0,2	20
	MX8.13	TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGAGCACGCATCCTCGCATTATCC GCATTAAACGACGATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTGCC	8,2 ± 0,3	21

Gene Parental	Clone ID	Genótipo/Fenótipo Relevante	Força da TIR Relativa	SEQ ID N:O:
	MX1 1.34	TCTAGAATTAT GAAGATTAAGACGGGCGCTCGCATTCTCGCATTATCC GCATTAACGACGATGATGTTCCGCCTCGGCTCTGCC	10,8 ± 0,5	22
<i>phoA</i>	PH1. 70	GCGCGCATTATG AAACAAATCCACGATTGCCCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	1,14 ± 0,05	23
	PH2. 64	GCGCGCATTATG AAACAGTCGACGATCGCACTGGCACTCTTACCGTT ACTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	1,93 ± 0,03	24
	PH3. wt	GCGCGCATTATG AAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	2,8 ± 0,1	25
	PH4. 67	GCGCGCATTATG AAAGCAATCTACTATCGCTCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	3,7 ± 0,1	26
	PH5. 71	GCGCGCATTATG AAAGCAATCAACTATCGCACTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	5,1 ± 0,3	27
	PH6. 77	GCGCGCATTATG AAACAAATCTACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	6,0 ± 0,4	28
	PL1. 104	ACGCGTATTATG AAACAGTCTACTATCGCTCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	1,00 ± 0,07	29
	PX2. 41	TCTAGAATTAT GAAGCAGAGTACGATTGCTCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	2,0 ± 0,1	30
	PX3. wt	TCTAGAATTAT GAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	3,39 ± 0,09	31
	PX5. 53	TCTAGAATTAT GAAGCAATCCACAATAGCTCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	4,9 ± 0,1	32
	PX6. 15	TCTAGAATTAT AAACAATCCACCATGGCCCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	5,9 ± 0,2	33
	PX8. 24	TCTAGAATTAT AAACAGTCTACTATCGCGCTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	8,0 ± 0,1	34
	PX1 0.23	TCTAGAATTAT GAACAAATCCACAATCGCACTGGCACTCTTACCGTTA CTGTTACCCCTGTGACAAAAGCC	10,0 ± 0,4	35

Gene Parental	Clone ID	Genótipo/Fenótipo Relevante	Força da TIR Relativa	SEQ ID N:O:
dsbA	DH1 .48	GCGCGCATTATGAAAAAAATTTGGCTGCCCTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	0,80 ± 0,03	36
	DH2 .wt	GCGCGCATTATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	1,89 ± 0,09	37
	DH3 .79	GCGCGCATTATGAAAAGATATGGCTGGCTCTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	2,92 ± 0,08	38
	DH7 .72	GCGCGCATTATGAAAAGATATGGTTGGCTCTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	6,7 ± 0,2	39
	DL1. wt	ACGCGTATTATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	1,0 ± 0,1	40
	DL2. 3	ACGCGTATTATGAAGAAAATTTGGTTGGCTCTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	1,87 ± 0,09	41
	DL3. 37	ACGCGTATTATGAAGAAAGATTTGGTTAGCACTGGCTGGTTAGTTTA GCGTTAGCGCATCGCG	2,6 ± 0,1	42

Legenda: a convenção de nomenclatura dos Clones é a seguinte: XY # = X designa a sequência sinal (S = STII, P = PhoA e assim por diante); Y designa a sequência de restrição (H significa o sítio de restrição Bssh11, X designa o sítio de restrição XbaI, L designa o sítio de restrição MluI) e # designa a força da TIR (por exemplo, 1 = TIR de 1, 7.72 = TIR de 7,72). wt = sequência TIR tipo selvagem.

TABELA 3**Títulos Da Fermentação No Tempo Final**

Sequência Sinal da Cadeia Pesada (TIR)/I Sequência Sinal da Cadeia Leve (TIR)	DsbA/C (+/-)	Titulação de Ab de comprimento total relativa*
STII (1)/STII (1)	-	1,0
STII (1)/STII (1)	+	4,9
STII (1)/PhoA (1)	-	0,6
STII (1)/PhoA (1)	+	5,6
STII (2)/STII (2)	+	0,8
MalE (1)/STII (1)	-	0,4
MalE (1)/PhoA (1)	-	0,4
MalE (1)/PhoA (1)	+	1,5
DsbA (1)/STII (1)	-	1,4
DsbA (1)/STII (1)	+	3,3
DsbA (1)/STII (2)	+	3,6
DsbA (2)/STII (1)	-	0,9
DsbA (1)/MalE (1)	-	1,7
DsbA (1)/MalE (1)	+	10,1
DsbA (1)/DsbA (1)	-	1,9
DsbA (1)/DsbA (1)	+	12,7
DsbA (2)/DsbA (2)	+	10,6
DsbA (1)/PhoA (1)	-	1,9
DsbA (1)/PhoA (1)	+	10,0
DsbA (2)/PhoA (1)	-	1,5
DsbA (2)/PhoA (1)	+	6,7
PhoA (1)/STII (1)	-	0,3

* Todas as amostras normalizadas pela titulação da amostra STII(1)/STII(1), que compreende o anticorpo de comprimento total expresso sem a presença das chaperonas DsbA e DsbC.

RESULTADO/DISCUSSÃO

[327] Nós desenvolvemos novas bibliotecas de peptídeo sinal da região de iniciação da tradução (TIR) variante (Figura 2, Tabela 2) para peptídeos sinal que representam duas das principais vias de secreção para o transporte através da membrana interna na *E. coli*: sec (PhoA, MalE) e SRP (DsbA, STII). Cada biblioteca compreende um painel de vetores compreendendo TIRs variantes de diferentes forças traducionais, fornecendo

meios para o fácil ajuste do nível de tradução de uma dada proteína de interesse. Os peptídeos sinal da proteína periplasmática de ligação a maltose (MalE) e fosfatase alcalina (PhoA) direcionam a translocação do citoplasma para o periplasma de maneira pós-traducional com o auxílio do motor molecular SecA. Os peptídeos sinal da enterotoxina II estável ao calor (stII) e proteína de intercâmbio tiol:bissulfeto (dsbA) direcionam a translocação de maneira co-traducional com a ajuda da partícula de reconhecimento de sinal (SRP) (Figura 1).

[328] Durante a construção da biblioteca, um sítio de restrição *BssHII*, *Mlul*, ou *Xba*I foi inserido nove pares de bases (pb) a montante do códon de iniciação do gene parental. Dependendo do tipo de sítio de restrição presente, diferentes faixas de força da TIR foram observadas (Figura 2). De modo geral, as sequências que possuíam o sítio *Mlul*, exibiram menores faixas de forças TIR (~ 1-3), enquanto as que possuíam o sítio *BssHII* a montante levaram a forças TIR moderadas (~ 1-8), e a presença do sítio *Xba*I levou a faixas mais altas (~ 1-11). Estes sítios de restrição presentes na região não traduzida estão abrangidos na TIR (3). Embora não se possa excluir que as variantes TIR mais elevadas podem existir para qualquer uma das combinações de peptídeo sinal/sítio de restrição examinados, estes resultados parecem ser representativos das forças TIR médias de cada biblioteca de peptídeo sinal examinada.

[329] Uma série de plasmídeos foi construída para ilustrar o efeito do nível de tradução e do peptídeo sinal sobre a secreção. Em cada caso, o gene de interesse foi inserido a jusante do promotor *phoA*, *trp* de Shine-Dalgarno e uma sequência sinal possuindo uma força da TIR relativa diferente. Após a transformação e a indução do promotor *phoA* em escala em frasco de agitação, os lisados de células inteiras expressando a proteína heteróloga, contendo o clone do anticorpo anti-c-met 5D5.v2, foram analisados por SDS-

PAGE. Nestes experimentos, a TIR de cadeia leve ou cadeia pesada foi variada, com a cadeia leve ou cadeia pesada correspondente, respectivamente, mantida invariável.

[330] A Figura 3 exibe os resultados da manipulação do peptídeo sinal da cadeia pesada. Quando sondada com um anticorpo α -Fc específico, a TIR variante com força de tradução um (ou “TIR de força um”) da ssDsbA-cadeia pesada forneceu um nítido aumento no anticorpo de comprimento total (FL-Ab), bem como no dímero pesado-leve (HL) e espécies pesado-pesado-leve (HHL), sobre todas as outras variantes do peptídeo sinal (Figura 3A, *blot* superior). Um exame da cadeia total pesada a partir destas amostras revelou níveis relativamente similares entre todas as fusões de peptídeos sinal examinados (Figura 3A, *blot* inferior). Quando a cadeia leve foi visualizada com um anticorpo α -kLc, resultados semelhantes foram obtidos, com a TIR variante de força um da ssDsbA-cadeia pesada novamente exibindo o nível mais alto de FL-Ab (Figura 3B, *blot* superior). Surpreendentemente, a amostra da fusão TIR de força um da DsbA – cadeia pesada, careceu de espécies de menor massa previstas – o dímero leve-leve (LL) e a cadeia leve livre – observadas nas outras amostras. De modo geral, no caso onde os sinais pós-traducionais (MalE, PhoA) são fundidos com a cadeia pesada, eles parecem ter a cadeia leve total mais expressa do que nos casos com as fusões de peptídeo sinal co-traducional (STH, DsbA) (Figura 3B, *blot* inferior). Em geral, a seguinte hierarquia foi observada em relação ao peptídeo sinal fundido com a cadeia pesada e a produção de anticorpo de comprimento total: DsbA> STII> MalE> PhoA. Notavelmente, a TIR variante da DsbA resultou na expressão aumentada (por exemplo, do anticorpo de comprimento total) em comparação com a TIR variante da STII, mesmo que a força da TIR relativa não se alterou (ou seja, ambas as forças TIRs eram de um).

[331] A Figura 4 exibe os resultados da manipulação do peptídeo

sinal da cadeia leve. A alteração do peptídeo sinal da cadeia leve de uma TIR variante “um” da STII para uma TIR variante de força “um” ou “dois” da PhoA produz um aumento notável no título do FL-Ab (Figura 4, *blot* superior). A modificação do peptídeo sinal fundido com a cadeia leve não pareceu afetar a quantidade total da cadeia pesada expressa (Figura 4, *blot* do meio), mas alterou significativamente a quantidade total da cadeia leve presente, com o maior acúmulo de cadeia leve processada aparecendo nas amostras com uma TIR variante de força dois da STII ou DsbA fundida com a cadeia leve (Figura 4, *blot* inferior). Quando fundido aos peptídeos sinal pós-traducionais, duas bandas foram observadas nas amostras de cadeia leve total, indicativo da cadeia leve não processada. Em geral, a seguinte hierarquia foi observada em relação as fusões do peptídeo sinal com a cadeia leve e a produção de anticorpo de comprimento total: PhoA \geq MalE $>$ STII $>$ DsbA.

[332] O monitoramento da montagem de espécies de anticorpos ao longo do tempo a partir de fermentações de 10 L revelou resultados semelhantes para as experiências em frascos agitados exibidas nas Figuras 3 e 4. A maior quantidade de FL-Ab foi observada a partir de amostras com uma TIR variante derivada da DsbA fundida com a cadeia pesada e qualquer peptídeo sinal derivado da DsbA ou PhoA fundido com a cadeia leve (Figura 5, *blot* superior). Estas amostras também mostraram mais espécies de dímeros HHL e HL em relação com as amostras com a fusão da cadeia pesada - TIR de força um da STII. Além disso, dímero LL e a cadeia leve livre foi prontamente visível nas amostras com o peptídeo sinal da TIR com força de tradução um da PhoA fundido com a cadeia leve. A avaliação de amostras de proteínas totais reduzidas revelou que a fusão do peptídeo sinal DsbA resultou em mais cadeia pesada total do que a fusão STII sob as condições de indução da expressão da fermentação (Figura 5, *blot* do meio). Da mesma forma que as fusões do peptídeo sinal da cadeia leve, um maior acúmulo de cadeia leve foi observado

com as fusões do peptídeo sinal TIR de força um da DsbA quando comparado com a TIR de força um da STII (Figura 5, *blot* inferior). No entanto, o maior acúmulo de cadeia leve foi observado com a fusão do peptídeo sinal TIR de força um da PhoA. As duas bandas observadas nas amostras de cadeia leve total a partir dos frascos de agitação parecem como uma banda única nas amostras de fermentação, indicativo de que a cadeia leve é mais eficientemente processada na fermentação de 10 L.

[333] Nós fundimos diferentes peptídeos sinal para o domínio maduro do gene *phoA* da *E. coli* (mPhoA) para examinar melhor as diferenças nos níveis de expressão da cadeia leve ou cadeia total quando fundido com TIRs variantes derivadas da STII ou DsbA e expressas em culturas em frascos agitados sob condições indutoras. Efeitos semelhantes sobre os níveis de expressão da cadeia leve e pesada total foram observados (Figura 6). Quando a expressão da proteína foi induzida, a expressão de mPhoA exibiu um aumento concomitante com a força da TIR aumentada para as fusões do peptídeo sinal da DsbA, com uma força TIR de até sete (a maior força da TIR utilizada neste estudo). Um aumento similar na expressão mPhoA com o aumento da força da TIR foi observado para as fusões do peptídeo sinal da STII quando a força da TIR de até seis ou oito foi alcançada, de modo que a quantidade de mPhoA parece diminuir em comparação com a mPhoA presente na amostra com TIR de força três da STII. Surpreendentemente, mais cadeia pesada e leve foram produzidas utilizando uma TIR da DbsA de força um do que quando foi utilizada uma TIR da STII de força um, e a translocação de PhoA induzida por STII atingiu um valor máximo a uma concentração de proteína total inferior do que a translocação de PhoA induzida por Dba. Além disso, a mudança da sequência TIR de STII para DsbA aumentou a faixa dinâmica de efeito da TIR.

[334] As amostras das fermentações de 10L foram analisadas

para os títulos de anticorpos utilizando um ensaio de HPLC baseado em proteína L (Tabela 3). Os dados de HPLC estão em boa concordância com os níveis de titulação qualitativa revelados pelo *Western blot* (Figuras 3, 4). Quando a sequência sinal de cadeia pesada foi alterada de uma variante TIR derivada da STII para um variante TIR derivada da Dsb, os títulos de FL-Ab aumentaram ~ 40-90%. Os títulos mais elevados foram produzidos quando um fusão de cadeia DsbA de um foi pareada com uma cadeia leve fundida com peptídeos sinal da TIR de força um derivadas da DsbA, MalE ou PhoA. Títulos mais elevados foram gerados quando a cadeia leve foi fundida com os peptídeos sinal da TIR da MalE ou PhoA.

[335] Em contrapartida, o título FL-Ab caiu quando um peptídeo de sinal pós-traducional foi fundido com a cadeia pesada, com um peptídeo sinal da TIR de força um da PhoA e TIR de força um da MalE exibindo uma queda de 70% e 60% no título, respectivamente. Concluiu-se que a expressão da cadeia pesada foi otimizada quando um peptídeo sinal co-traducional (por exemplo, DsbA) foi usado para direcionar a tradução.

[336] Testamos o efeito da superexpressão de chaperona. A superexpressão das chaperonas DsbA e DsbC (por vezes designadas como DsbA/C no presente) melhorou os benefícios do peptídeo sinal DsbA fundido com a cadeia pesada e os sinais DsbA, PhoA, ou MalE fundidos com a cadeia leve. Quando comparados com a expressão de FL-Ab por um sinal da TIR de força um da STII fundido com as cadeias pesadas e leves (SS1.1 + Chaperonas), um aumento aproximado de 2 a 2,5 vezes no título de FL-Ab foi observado com uma fusão TIR de força um da DsbA – cadeia pesada combinada com a fusão TIR de força um da MalE, PhoA ou DsbA - cadeia leve.

[337] Nós examinamos a relação entre o peptídeo sinal fundido com a cadeia leve e cadeia pesada de um anticorpo e a titulação final dos anticorpos. Os títulos de anticorpos completamente montados (FL-Ab) foram

maiores quando um peptídeo sinal co-traducional (por exemplo, STII ou DsbA) foi fundido com a extremidade N-terminal da cadeia pesada com TIRs variantes derivadas da DsbA, resultando no rendimento máximo de FL-Ab observado. Assim, as TIRs variantes da DsbA podem permitir níveis mais elevados de tradução de proteínas passageiras do que as TIRs variantes da STII sob condições indutoras, resultando assim em níveis mais elevados de expressão de proteína passageira processada. Em contrapartida, os títulos de anticorpos caem dramaticamente quando qualquer peptídeo sinal pós-traducional (ou seja, MalE ou PhoA) foi fundido com a cadeia pesada. Este efeito pode ser devido à proteólise ou pode ser devido a uma via de enovelamento diferente seguida pela cadeia pesada (6). Um exame dos níveis totais de cadeia pesada a partir de amostras expressando um peptídeo sinal da TIR com força de tradução um da PhoA ou MalE fundido com a cadeia pesada revelou uma ligeira alteração na massa aparente, potencialmente devido à presença de cadeia pesada não processada (Figura 3A, *blot* inferior).

[338] A fusão de peptídeo sinal pós-traducional TIRs variantes derivados da MalE ou PhoA com a cadeia leve resultou em um grande acúmulo de cadeia leve processada e títulos de anticorpos aumentado ao longo da translocação mediada por STII durante a fermentação em 10L (Figura 5, *blot* inferior). Os rendimentos aumentados tanto da cadeia leve como de FL-Ab também foram observados quando a cadeia leve foi translocada por TIRs variantes da DsbA, em comparação com cadeia leve translocada por TIRs variantes da STII. No entanto, a quantidade de cadeia leve total expressa a partir da TIR variante de força de tradução um da DsbA não foi tão maior do que a TIR variante de força de tradução um da PhoA ou MalE. Curiosamente, a análise de amostras colhidas ao longo do tempo a partir da fermentação de 10L indicou que os títulos de FL-Ab a partir dos experimentos realizados com a cadeia leve fundida com TIRs variantes derivadas da MalE, DsbA ou PhoA

continuou a aumentar ao longo do tempo, enquanto as fusões com TIRs variantes da STII alcançaram não apenas uma titulação Max inferior, como também atingiu este nível de titulação em um ponto de tempo muito mais precoce (Figura 5, *blot* superior). Assim, estes dados sugerem que a cadeia leve pode ser eficazmente translocada tanto de forma co-traducional como de forma pós-traducional, enquanto a cadeia pesada requer a uma translocação co-traducional para o pico de expressão.

[339] *Expressão de um de um anticorpo anti-c-met de braço único:* Nós avaliamos a relação entre o peptídeo-sinal fundido com a cadeia leve, cadeia pesada e Fc de um anticorpo de braço único, e com os títulos finais de anticorpos. Os plasmídeos foram construídos utilizando as sequências sinal STII com as TIRs de 1 para a cadeia leve, cadeia pesada, e polipeptídeo Fc, utilizando a sequência sinal da PhoA com uma TIR de 1 (SEQ ID NO: 29) para a cadeia leve e sequência sinal da DsbA com uma TIR de 1 (SEQ ID NO: 40) para a cadeia pesada e fragmento Fc; e utilizando a sequência sinal da PhoA com uma TIR de 1 para a cadeia leve e fragmento Fc, e a sequência sinal da DsbA com uma TIR de 1 para HC. Os números da titulação relativa eram provenientes das amostras após a execução da fermentação e foram mensurados utilizando o ensaio de HPLC de fase reversa em proteína L descrito anteriormente. Os valores da titulação relativa foram normalizados em relação ao título para o caso na primeira linha da Tabela 4 - sequências sinal da STH e TIR = 1 para LC, HC, e Fc sem a coexpressão de DsbA/C.

[340] Os resultados estão exibidos na Tabela 4. Os títulos relativos de anticorpos de braço único foram maiores quando um peptídeo sinal co-traducional (por exemplo, DsbA) foi fundido com a extremidade N-terminal da cadeia pesada, um peptídeo sinal pós-traducional (por exemplo, PhoA) foi fundido com a extremidade N-terminal da cadeia leve, e um peptídeo sinal pós-traducional (por exemplo, PhoA) foi fundido com a região Fc, e a expressão

ocorreu na presença de DsbA/C. Em geral, a seguinte hierarquia foi observada em relação ao peptídeo sinal fundido com a cadeia leve, cadeia pesada e fragmento Fc, e a expressão do anticorpo de braço único na presença de DsbA/C: P.D.D > P.D.P.> S.S.S. Os níveis de expressão na ausência de DsbA/C foram semelhantes em todas as amostras testadas, em que a maior parte do anticorpo secretado para o periplasma foi agregada. A coexpressão de chaperonas de pontes de bissulfeto aumentou o anticorpo enovelado produzido, revelando assim um aumento na expressão do anticorpo realizado pela otimização da TIR.

TABELA 4

EXPRESSÃO DE UM DE UM ANTICORPO ANTI-C-MET DE BRAÇO ÚNICO

MONOVALENTE (METMAB)

Plasmídeo	LC, HC, Fc	DsbA/C	Título relativo
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 para Lc, Hc, e Fc	-	1,0
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 para Lc, Hc, e Fc	+	1,7
pPDD.111.MetMab	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc e Fc	-	1,0
pPDD.111.MetMab	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc e Fc	+	3,8
pPDP.111.MetMab	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc, PhoA TIR para Fc	-	0,7
pPDP.111.MetMab	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc, PhoA TIR para Fc	+	2,5

Abreviações: D = sequência sinal da DsbA; P = sequência sinal da PhoA.

XX#.# (Por exemplo, PDP.111) refere-se a sequência sinal de cadeia leve, sequência sinal de cadeia pesada, sequência sinal de Fc, TIR da cadeia leve, TIR da cadeia pesada, TIR de Fc utilizados no experimento.

[341] Em resumo, esta tecnologia oferece um novo meio para aumentar o rendimento de anticorpos enovelados, por exemplo, em *E. coli* pela

manipulação da expressão da cadeia leve e cadeia pesada por meio da seleção de um novo arranjo de TIRs variantes e adicionalmente pela utilização da sequência sinal co-traducional ou pós-traducional para a cadeia leve e sequência sinal co-traducional para a cadeia pesada. A expressão melhorada de anticorpos de braço único compreendendo uma cadeia pesada, uma cadeia leve e uma região Fc também foi realizada utilizando as novas TIRs variantes divulgadas na presente invenção, e adicionalmente pelo uso da sequência sinal co-traducional ou pós-traducional para a cadeia leve, sequência sinal co-traducional para a cadeia pesada, e sequência sinal co-traducional ou pós-traducional para o polipeptídeo Fc resultante. A utilidade deste método parece ser amplamente aplicável a uma grande variedade de anticorpos (por exemplo, anticorpos biespecíficos compreendendo mutações “knob” e “hole”), derivados de anticorpos e na produção de proteína recombinante baseada em bactérias como um todo.

LISTA DE REFERÊNCIA PARCIAL

1. Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P., e Yansura, D. G. (2002) *Journal of immunological methods* 263(1-2), 133-147
2. Stemmer, W. P., Morris, S. K., Kautzer, C. R., e Wilson, B. S. (1993) *Gene* 123(1), 1-7
3. Simmons, L. C., e Yansura, D. G. (1996) *Nature biotechnology* 14(5), 629-634
4. Le Calvez, H., Green, J. M., e Baty, D. (1996) *Gene* 170(1), 51-55
5. Jackson, R. W., e DeMoss, J. A. (1965) *Journal of bacteriology* 90(5), 1420-1425
6. Kadokura, H., e Beckwith, J. (2009) *Cell* 138(6), 1164-1173 [342] Embora as referências citadas acima se refiram a

realizações específicas, deverá ser compreendido que a presente invenção não é dessa forma limitada. Ocorrerá para os técnicos hábeis no assunto que diversas modificações podem ser feitas às realizações divulgadas sem se desviar do conceito geral da presente invenção. Pretende-se que todas essas modificações estejam incluídas no escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende a cultura de uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo que compreende (1) uma primeira região de iniciação da tradução (TIR) operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada de anticorpo, em que a primeira TIR compreende uma sequência sinal de secreção de co-tradução procariótica de DsbA selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NO: 36-39, 41 e 42; e (2) uma segunda TIR operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve de anticorpo, em que a segunda TIR compreende uma sequência sinal de secreção de co-tradução ou pós-tradução procariótica, em que após a expressão do anticorpo em uma célula hospedeira, a cadeia leve e cadeia pesada são enoveladas e montadas para formar um anticorpo biologicamente ativo.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a segunda região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal da STII, DsbA, MalE ou PhoA selecionada do grupo consistindo das SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, e 41-42.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende ainda (3) uma terceira região de iniciação da tradução operacionalmente ligada a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo Fc.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a terceira região de iniciação da tradução compreende uma sequência sinal da STII, Phol ou DsbA.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a terceira região de iniciação da tradução compreende a sequência de uma das SEQ ID NOs: 23, 24, 26 a 39, 41 e 42.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a primeira e a segunda regiões de iniciação da tradução fornecem forças de tradução iguais.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que a primeira, a segunda e a terceira regiões de iniciação da tradução fornecem forças de tradução iguais.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo na célula hospedeira compreende ainda um promotor.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o promotor é um promotor procariótico selecionado a partir do grupo consistindo no promotor phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara e T7.

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula procariótica.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a célula procariótica é *E. coli*.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a *E. coli* é de uma cepa deficiente nas atividades de protease endógena.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 12, caracterizado pelo fato de que o genótipo da *E. coli* carece dos genes *degP* e *prc* e carrega um gene *spr* mutante.

14. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende adicionalmente um polinucleotídeo que codifica pelo menos um polipeptídeo procariótico selecionado a partir do grupo consistindo em DsbA, DsbC, DsbG e FkpA.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica ambos DsbA e DsbC.

16. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo de afinidade maturado, um anticorpo biespecífico, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou um anticorpo humano.

18. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende um ou mais polinucleotídeos que codificam coletivamente o anticorpo.

19. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda a recuperação do anticorpo a partir da cultura da célula hospedeira, e a combinação do anticorpo recuperado com um veículo, excipiente ou carreador farmaceuticamente aceitável para preparar uma formulação farmacêutica compreendendo o anticorpo.

20. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda a recuperação do anticorpo a partir da cultura de célula hospedeira e em que pelo menos 50% dos complexos de polipeptídeos de imunoglobulina que são formados são os anticorpos.

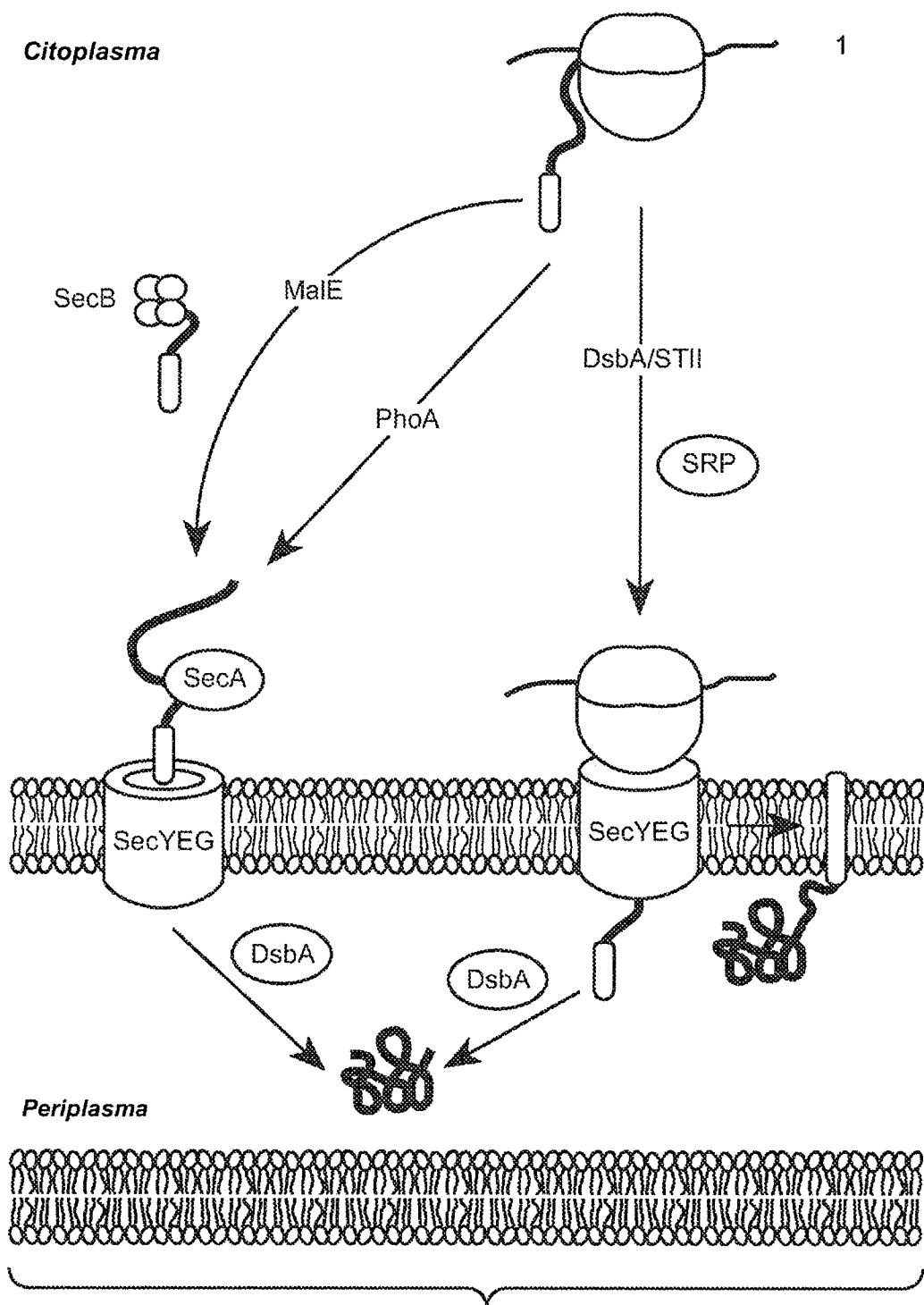


Fig. 1

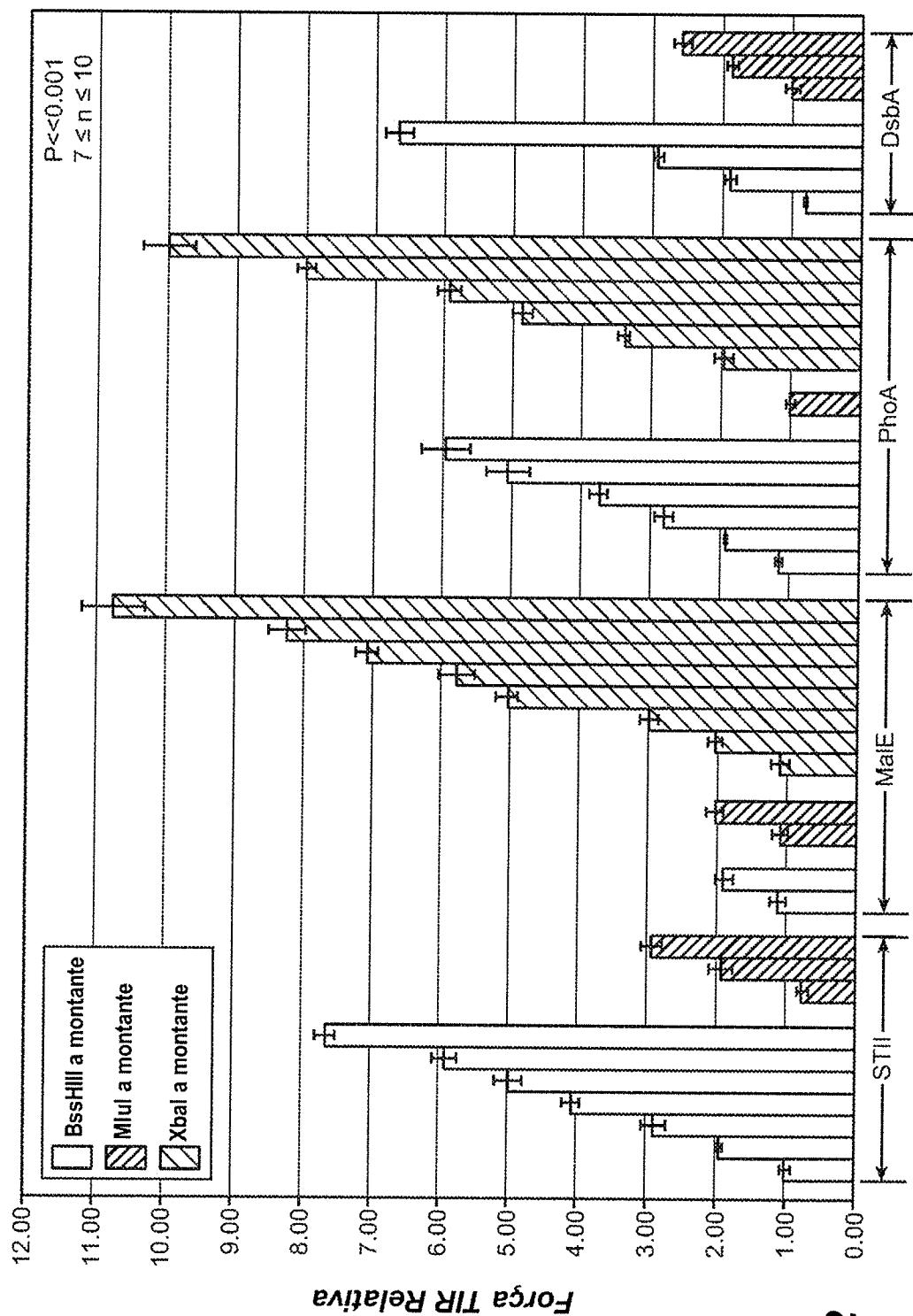
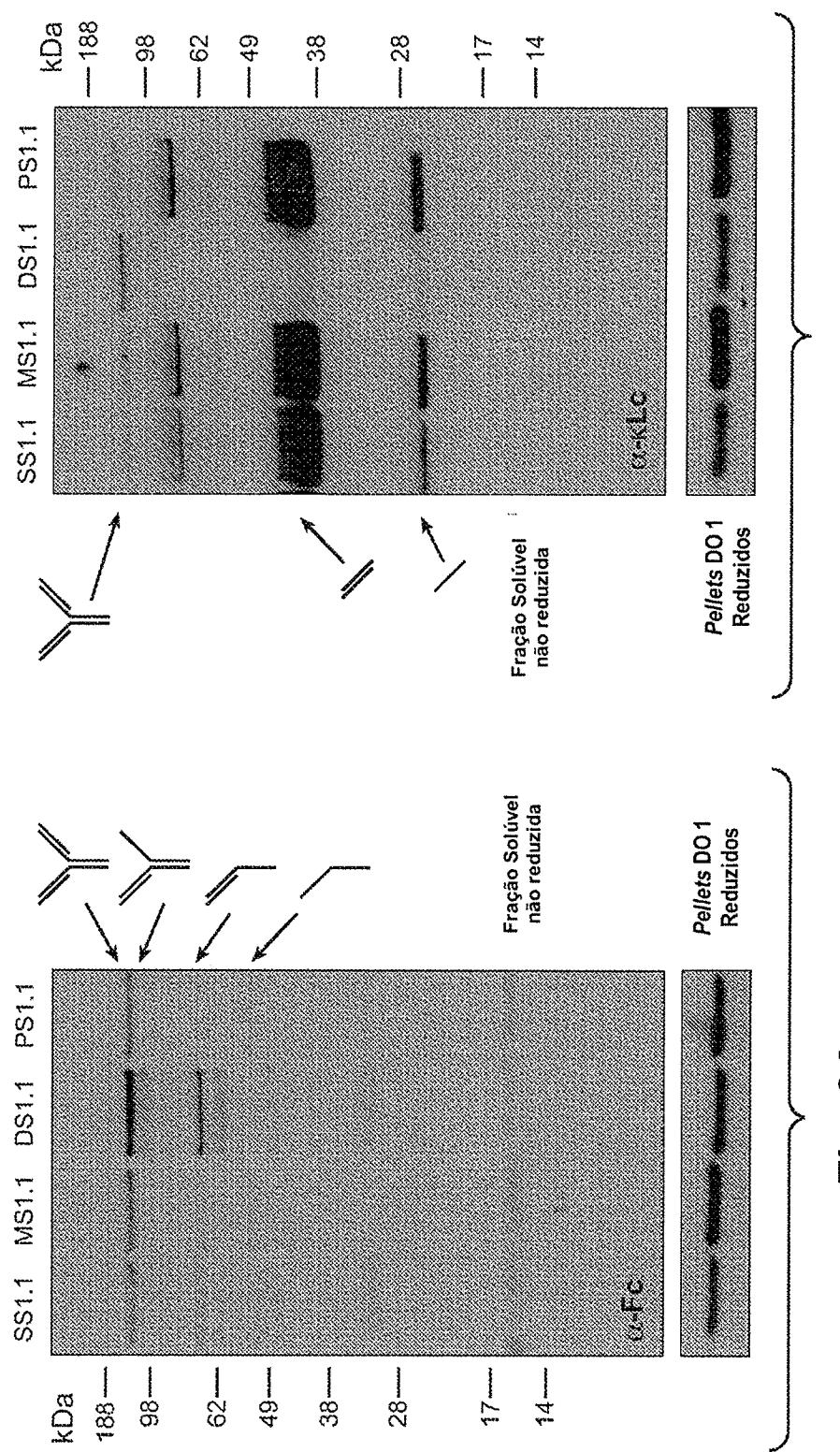


Fig. 2



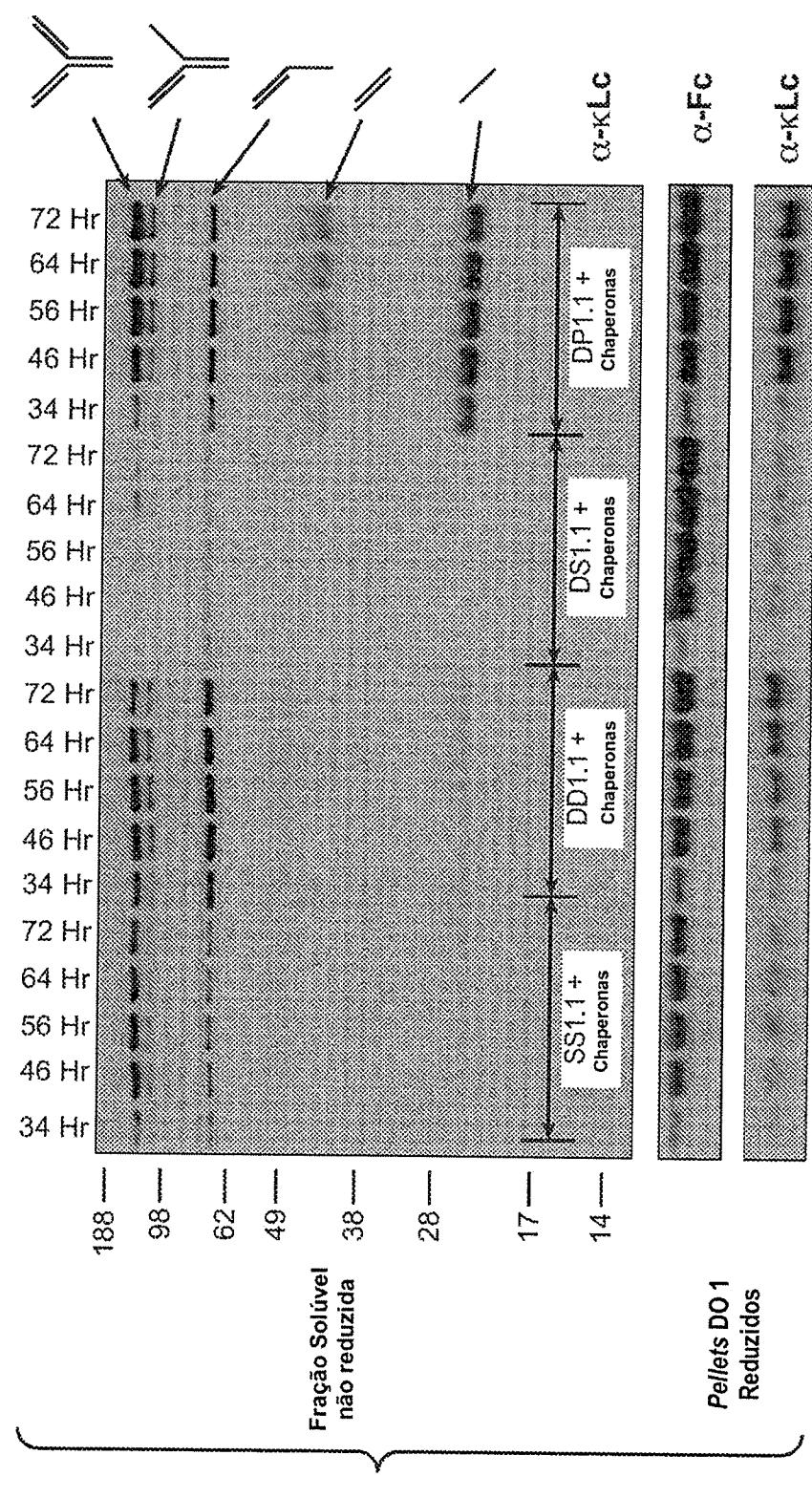
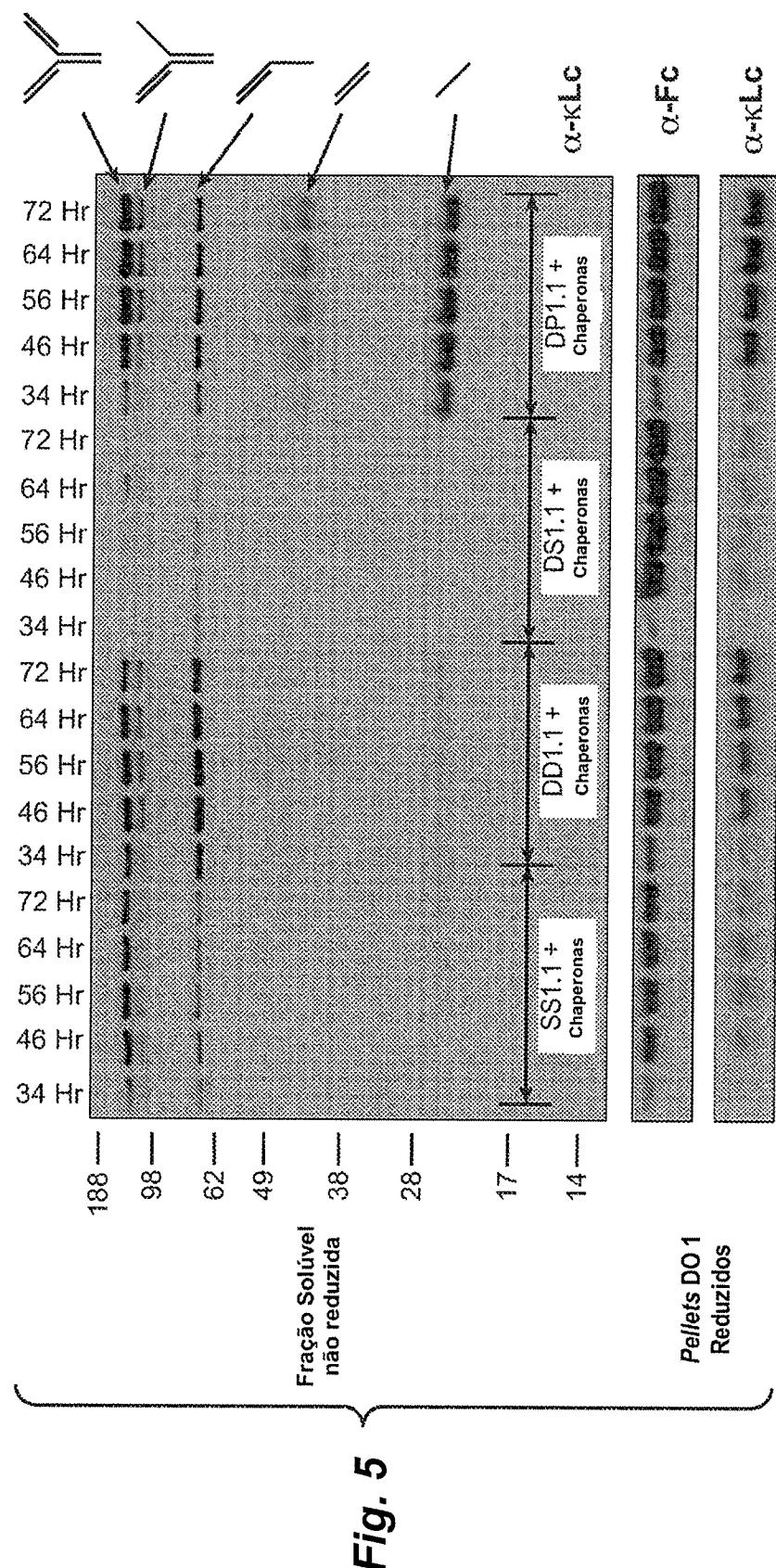


Fig. 4



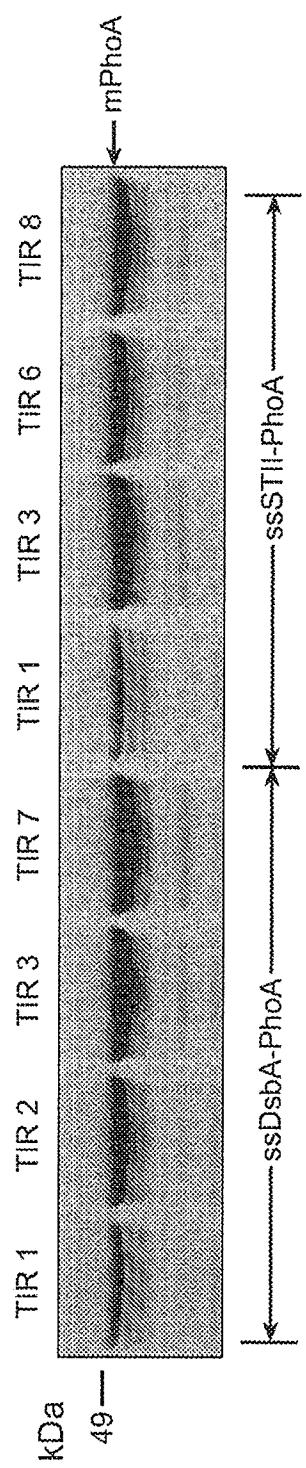


Fig. 6

Fig. 7

5D5.v2 Cadeia Leve	
FR1-LC:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
FR2-LC:	WYQQKPKGKAPKLLIY
FR3-LC:	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC
FR4-LC:	FGQGTTKVEIKR
CDR1-LC:	KSSQSLLYTSSQKNYLA
CDR2-LC:	WASTRES
CDR3-LC:	QQYYAYPWT
CL1:	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTSKADYEKKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5D5.v2 Cadeia Pesada

FR1-HC:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
FR2-HC:	WVRQAPGKGLEWV
FR3-HC:	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
FR4-HC:	WGQGTLVTVSS
CDR1-HC:	GYTFTSYWLH
CDR2-HC:	GMIDPSSNSDTRFPNFKD
CDR3-HC:	ATYRSYVTPLDY
CH1:	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGQTYYCIVNVNHPNSNTVKDKKVEPKSCDKHT CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

Fig. 8

Fc:	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIASKKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK
------------	--