



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

**(11) PI 0918768-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 27/08/2009**

**(45) Data de Concessão: 30/08/2022**

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO RECOMBINANTE DE ANTIRECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/28.

**(30) Prioridade Unionista:** 02/09/2008 US 61/136,391; 29/08/2008 DK PA 2008 01202.

**(73) Titular(es):** SYMPHOGEN A/S.

**(72) Inventor(es):** MIKKEL WANDAHL PEDERSEN; MICHAEL KRAGH; ADAM S. HEY; HELLE JACOBSEN.

**(86) Pedido PCT:** PCT DK2009050217 de 27/08/2009

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/022736 de 04/03/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 28/02/2011

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO RECOMBINANTE DE ANTI-RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO. A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos recombinantes para uso na terapia do câncer humano. Mais especificamente, a invenção fornece o uso de uma composição de anticorpo com duas especificidades de ligação não superpostas distintas a EGFR humano. A composição de anticorpo é eficaz no tratamento de câncer acompanhando o tratamento com outros anticorpos anti-EGFR, se o câncer mostrar progressão durante ou acompanhando o tratamento prévio ou não. A composição de anticorpo pode ser usada também para o tratamento repetido de tumores recorrentes acompanhando a terapia de primeira linha com a composição de anticorpo de invenção, já que a composição não leva à seleção de tumores resistentes. Um uso terapêutico adicional é o uso de uma composição de anticorpo da invenção para o tratamento de câncer que é resistente a anticorpos anti-EGFR conhecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÕES DE ANTICORPO RECOMBINANTE DE ANTI-  
RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO".**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção refere-se ao campo de anticorpos recombinantes para uso na terapia do câncer humano.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0002] O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) desempenha um papel importante na proliferação celular assim como na apoptose, angiogênese e disseminação metastática, processos que são cruciais para a progressão do tumor (Salomon DS *et al*, Crit. Rev. in Oncology/ Haematology, 19:183-232 (1995); Wu *et al*, J. Clin. Invest., 95:1897-1905 (1995); Karnes *et al*, Gastroenterology, 114:930-939 (1998); Woodburn *et al*, Pharmacol. Therap. 82: 241-250 (1999); Price *et al*, Eur. J. Cancer, 32A:1977-1982 (1996)). De fato, estudos têm mostrado que o crescimento celular mediado por EGFR está aumentado em uma variedade de tumores sólidos, incluindo o câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de próstata, câncer de mama, câncer gástrico e tumores de cabeça e pescoço (Salomon DS *et al*, Crit. Rev. in Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995)). Adicionalmente, a ativação excessiva de EGFR sobre a superfície da célula cancerosa é conhecida agora estar associada com a doença avançada, o desenvolvimento de um fenótipo metastático e um prognóstico sombrio em pacientes com cancer (Salomon DS *et al*, Crit. Rev. in Oncology/ Haematology, 19:183-232 (1995)).

[0003] Adicionalmente, a expressão de EGFR é frequentemente acompanhada pela produção de ligantes de EGFR, TGF-alfa e EGF entre outros, pelas células do tumor que expressam EGFR, o que sugere uma alça autócrina na progressão dessas células (Baselga, *et al.*(1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154; Modjtahedi, *et al.* (1994)

Int. J. Oncology. 4: 277-296). O bloqueio da interação entre tais ligantes de EGFR e EGFR, portanto, podem inibir o crescimento e a sobrevivência do tumor (Baselga, *et al.*(1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154).

[0004] EGFR é uma glicoproteína ligada à membrana com um peso molecular de aproximadamente 170 kDa. EGFR consiste em um domínio de ligação a um ligante externo glicosilado (621 resíduos) e um domínio citoplasmático (542 resíduos) conectados por um ligante transmembrana curto com 23 aminoácidos. A parte extracelular de EGFR contém 25 ligações dissulfeto e 12 sítios de glicosilação ligados a N e é geralmente considerada consistir em quatro subdomínios. As estruturas cristalinas por raio X de EGFR sugerem que o receptor adota ambas a conformação ligada auto-inibida que não pode se ligar a EGF (Ferguson *et al.*, Mol Cell, 2003, vol 11: 507-517) e uma conformação ativa que pode mediar a ligação ao ligante de EGF e a dimerização do receptor (Garret *et al.*, Cell 2002, vol 110:763-773; Ogiso *et al.*, Cell, 2002, vol 110:775-787). Em particular, o domínio I e o domínio III têm sido sugeridos fornecer contribuições aditivas para a formação de um sítio de ligação ao ligante de alta afinidade. Os domínios II e IV são regiões semelhantes à laminina ricas em cisteína que estabilizam o enovelamento da proteína e contêm uma possível interface de dimerização de EGFR.

[0005] EGFR é conhecido por existir em várias conformações diferentes sobre a superfície celular, onde a conformação ligada ou bloqueada é a mais frequente. A conformação ligada não pode dimerizar e, portanto é inativa. O anticorpo terapêutico Erbitux é conhecido por estabilizar a conformação ligada pela ligação ao domínio III e dificultar estericamente o receptor na obtenção do estado não amarrado. Entretanto, alguns receptores ainda podem ser capazes de adotar a conformação não ligada, de ligar ao ligante e

dimerizar. Um anticorpo monoclonal (mAb) só será tipicamente eficaz na ligação contra uma das conformações e, portanto, não pode atingir eficazmente células de câncer que exibem outras conformações ou células de câncer que exibem uma variedade de conformações.

[0006] Anticorpos monoclonais (mAbs) direcionados para o domínio de ligação ao ligante de EGFR podem bloquear a interação com os ligantes de EGFR e, concomitantemente, a via de sinalização intracelular resultante.

[0007] Erbitux™ (Cetuximab) é um anticorpo monoclonal quimérico recombinante de humano/camundongo que se liga especificamente ao domínio extracelular de EGFR humano. Erbitux é composto das regiões Fv de um anticorpo anti-EGFR de murino com as regiões constantes da cadeia pesada e kappa leve de IgG1 humana e tem um peso molecular aproximado de 152 kDa. Erbitux é produzido em cultura de célula de mamífero (mieloma de murino). Erbitux está aprovado para o tratamento de pacientes com câncer colo-retal metastático e cujo tumor expressa EGFR. Adicionalmente, Erbitux é usado em combinação com a terapia de radiação para tratar pacientes com câncer de células escamosas de cabeça e pescoço que não podem ser removidos por cirurgia ou como tratamento de segunda linha de câncer de célula escamosa de cabeça e pescoço que não respondeu a terapia padronizada baseada em platina.

[0008] Vectibix™ (panitumumab) é um anticorpo monoclonal recombinante de kappa de IgG2 humana que se liga especificamente a EGFR humano. Vectibix tem um peso molecular aproximado de 147 kDa. Panitumumab é produzido em células de mamífero manipuladas geneticamente (Ovário de Hamster Chinês). Vectibix está aprovado para o tratamento de pacientes com câncer colo-retal metastático e cujo tumor expressa EGFR com progressão da doença ou acompanhando os regimes de quimioterapia que contêm

fluorpirimidina, oxaliplatina e irinotecan.

[0009] Cetuximab, comercializado pela Imclone sob o nome comercial de Erbitux, está descrito em US 4.943.533 e WO 96/40210. Panitumumab, comercializado pela Abgenix sob o nome comercial de Vectibix, está descrito em US 6.235.883. Zalutuzumab (Humax-EGFR) é outro anticorpo anti-EGFR atualmente submetido ao desenvolvimento clínico. O anticorpo foi desenvolvido pela Genmab e está descrito no WO 02/100348 e WO 2004/056847. Cetuximab, Panitumumab e Zalutuzumab se ligam ao mesmo epítopo sobre EGFR.

[00010] Nimotuzumab (TheraCIM hR3) descrito em US 5.891.996 e US 6.506.883 está aprovado para o tratamento de câncer em vários países em torno do mundo, mas não na Europa ou Estados Unidos.

[00011] Anticorpos anti-EGFR adicionais que estão ou estiveram sob desenvolvimento clínico incluem:

- ICR62 desenvolvido pelo The Institute of Cancer Research. O anticorpo está descrito em WO 95/20045.

- mAb806, que é um anticorpo monoclonal direcionado contra uma forma mutante de EGFR, (EGFR vIII). O anticorpo é desenvolvido pelo Ludwig Institute of Cancer Research e está descrito no WO 02/092771.

- Matuzumab (EMD72000) desenvolvido por Merck-Serono está descrito no WO 02/66058. O precursor de murino, mAb425 está descrito no WO 92/15683.

[00012] É sabido na técnica que a exposição prolongada a um anticorpo monoclonal pode causar seleção de tumores resistentes. Tal situação pode surgir em pacientes que recebem tratamento prolongado com um anticorpo monoclonal. Com o uso difundido de Erbitux (da Imclone) e Vectibix (da Abgenix), dois anticorpos monoclonais que se ligam ao mesmo epítopo, é provável que os

clínicos encontrem tumores com resistência a esses anticorpos. Anticorpos monoclonais adicionais estão em teste clínico e podem entrar no comércio nos próximos anos. Entre esses está Humax-Egfr (Zalutumumab da Genmab) que se liga ao mesmo epítopo como Erbitux e Vectibix. Pode ser presumido que um tumor sendo resistente a qualquer um desses três anticorpos monoclonais também é resistente aos outros dois.

[00013] Igualmente, pode haver exemplos clínicos de tumores resistentes a qualquer um dos outros anticorpos monoclonais anti-EGFR que estão atualmente em teste clínico: Nimotuzumab (YM Biosciences, Cuba), Matuzumab (Merck KGaA), mAb806 (Ludwig Institute) e ICR62 (Institute of Cancer Research).

[00014] A resistência completa ou parcial do tumor a qualquer um desses anticorpos monoclonais pode ser ensaiada usando uma amostra isolada de um paciente, tal que possa ser conhecido, *a priori*, se o tumor é resistente ou não.

[00015] Além da resistência a terapia com anticorpo monoclonal (ou tumores refratários), outro problema no tratamento de cânceres que expressam EGFR é a recorrência ou progressão do tumor depois da cirurgia, terapia de radiação e/ou tratamento médico com quimioterapêuticos, inibidores da tirosina quinase (TKIs) e/ou anticorpos monoclonais. Há uma presunção de que um tumor recorrente ou progressivo deve ser tratado com um medicamento diferente já que a recorrência ou progressão podem ser o resultado de resistência ou pelo menos de resistência parcial. Portanto, há uma necessidade de uma segunda ou terceira linha de tratamento de câncer que não é responsável a um tratamento anterior com o anticorpo anti-EGFR ou que progride depois do dito tratamento anterior com o anticorpo anti-EGFR.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00016] Os presentes inventores verificaram que uma linhagem celular de câncer sendo resistente ao Erbitux (Cetuximab) pode ser tratada efetivamente *in vitro* com uma composição de anticorpo da presente invenção, apesar da exposição da linhagem celular resistente a Vectibix (Panitumumab) ser tão ineficaz como é o tratamento com Erbitux. É esperado que Zalutumumab também seja ineficaz contra essa linhagem celular. Esses resultados levaram a conclusão de que uma composição de anticorpo da presente invenção é eficaz contra tumores resistentes a Erbitux, Vectibix e Zalutumumab. Portanto, uma composição de anticorpo da presente invenção pode ser usada para tratar pacientes que não respondem a nenhum desses produtos. Igualmente, uma composição de anticorpo da presente invenção pode ser usada para tratar tumores que são inicialmente resistentes a qualquer um desses anticorpos monoclonais. A resistência a um anticorpo monoclonal tal como Erbitux pode ser ensaiada *in vitro* usando os métodos descritos no Exemplo 21. Portanto, quando uma linhagem de célula de câncer prolifera em um meio contendo 10 µg/mL de Erbitux, ela é considerada parcialmente resistente ao Erbitux. A resistência a Panitumumab e Zalutumumab pode ser ensaiada da mesma maneira.

[00017] Baseado nessas observações, os inventores também consideram o uso de uma composição de anticorpo da presente invenção para o tratamento de câncer que é resistente ou parcialmente resistente a qualquer um dos outros anticorpos anti-EGFR que estão atualmente sob desenvolvimento, incluindo, mas não limitado a Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses.

[00018] Os resultados foram confirmados por um estudo *in vivo* (Exemplo 23), onde uma linhagem de célula de câncer agressivo foi

implantada em camundongos. Depois do tratamento inicial com Erbitux, os responsivos parciais foram selecionados expostos tanto ao tratamento prolongado com Erbitux quanto ao tratamento com uma composição de anticorpo da presente invenção. O último resultou em redução rápida no tamanho dos tumores, enquanto que o tratamento contínuo com Erbitux resultou em manutenção do tamanho do tumor. A eficácia pré-clínica é obtida mesmo quando há uma superposição parcial na ligação entre Erbitux e os anticorpos 1024 e 992 da presente invenção. Portanto, imediatamente depois de trocar de Erbitux para a terapia com 1024/992, haverá resíduos de Erbitux nos tumores e haverá competição na ligação entre Erbitux e os dois anticorpos da composição da presente invenção reduzindo potencialmente a eficácia da composição de anticorpo da presente invenção. Entretanto, isso não afeta significativamente a eficácia do tratamento com 1024/992.

[00019] Um estudo *in vivo* também confirmou (Exemplo 25) que as células resistentes ao Erbitux podem ser eficientemente tratadas com a combinação de anticorpos da presente invenção. Portanto, o mecanismo de resistência adquirido contra Erbitux não afeta a eficácia da composição de anticorpo da presente invenção.

[00020] Em conclusão, uma composição de anticorpo da invenção pode ser usada para tratar um câncer que seja resistente ou parcialmente resistente a um anticorpo monoclonal anti-EGFR tal como Erbitux e para tratar câncer em um indivíduo que recebeu tratamento com um anticorpo monoclonal anti-EGFR, tal como Erbitux, em um regime de tratamento prévio.

[00021] Baseado na ligação idêntica de Erbitux, Vectibix e Zalutumumab, é esperado que resultados similares possam ser obtidos para esses três mAbs. Baseado nessas observações, os inventores também observaram o uso de uma composição de

anticorpo da presente invenção no tratamento de câncer que tenha sido previamente tratado com outro anticorpo monoclonal anti-EGFR incluindo, mas não limitado a Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses. A eficácia de tal tratamento pode ser verificada em um estudo pré-clínico similar ao estudo descrito no Exemplo 23.

[00022] Adicionalmente, os presentes inventores determinaram que o crescimento recorrente do tumor que acompanha o tratamento com uma composição de anticorpo da presente invenção pode ser eliminado com sucesso usando uma composição de anticorpo da presente invenção. Isso foi demonstrado no estudo pré-clínico descrito no Exemplo 22. Tumores recorrentes foram eliminados tão eficientemente quanto os tumores originalmente implantados, indicando claramente que esses tumores não eram resistentes ao tratamento com uma composição de anticorpo invenção.

[00023] Portanto, em um primeiro aspecto, a invenção refere-se a uma composição de anticorpo para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo que tenha sido submetido a um regime de tratamento anterior envolvendo um anticorpo anti-EGFR humano, a dita composição de anticorpo compreendendo pelo menos duas moléculas distintas de anticorpo anti-EGFR humano,

a. em que uma primeira molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 109 de SEQ ID NO:72) e VH (aminoácidos 3 a 124 de SEQ ID NO:40) do anticorpo 992, um anticorpo que possua as CDR3s do anticorpo 992 (SEQ ID NO:116 e 111), um anticorpo que se ligue ao mesmo epítopo como o anticorpo 992 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 992 a EGFR humano; e

b. em que uma segunda molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 114 de SEQ ID NO:73) e VH (aminoácidos 3 a 120 de SEQ ID NO:41) do anticorpo 1024, um anticorpo que possua as CDR3s do anticorpo 1024 (SEQ ID NO:120 e 114), um anticorpo que se ligue ao mesmo epítopo como o anticorpo 1024 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1024 a EGFR humano.

[00024] Em uma modalidade, o dito regime de tratamento anterior envolve uma composição de anticorpo idêntica à dita composição de anticorpo.

[00025] Em outra modalidade, o dito regime de tratamento anterior envolve um anticorpo anti-EGFR humano selecionado do grupo que consiste em Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses. Preferivelmente, o dito anticorpo anti-EGFR humano é selecionado do grupo que consiste em Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses. Mais preferivelmente, o dito anticorpo anti-EGFR humano é selecionado do grupo que consiste em Cetuximab e Panitumumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses. Mais preferivelmente, o dito anticorpo anti-EGFR humano é Cetuximab ou um anticorpo capaz de ligar ao mesmo epítopo como Cetuximab.

[00026] O câncer pode ser selecionado do grupo que consiste em câncer de cabeça e pescoço, câncer de cólon, câncer de mama, câncer renal, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de próstata, glioma, câncer pancreático, câncer de bexiga, carcinoma de pulmão de célula não pequena (NSCLC), câncer gástrico, câncer cervical, câncer hepato-cellular, câncer gastro-esofágico, câncer colo-retal,

câncer retal, carcinoma epitelioides, RCC, carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (SCCHN), câncer de esôfago, glioblastoma multiforme, carcinoma de célula escamosa e câncer de rim, melanoma, carcinoma e sarcoma como descritos aqui.

[00027] O tratamento com anticorpo pode ser uma terapia adjuvante, depois da cirurgia e/ou da terapia com radiação.

[00028] O tratamento pode ser uma terapia de combinação que envolve o tratamento com quimioterapia e/ou pelo menos um dos inibidores de tirosina quinase e/ou pelo menos um inibidor da angiogênese e/ou pelo menos um hormônio e/ou pelo menos um agente indutor da diferenciação.

[00029] O regime de tratamento anterior pode ser uma terapia de primeira linha, uma terapia de segunda linha ou uma terapia de terceira linha.

[00030] A terapia de primeira linha pode envolver, adicionalmente, um regime de tratamento com quimioterapia e/ou pelo menos um dos inibidores de tirosina quinase e/ou pelo menos um inibidor da angiogênese e/ou pelo menos um hormônio e/ou pelo menos um agente indutor da diferenciação.

[00031] A quimioterapia inclui preferivelmente a administração de um composto quimioterapêutico selecionado do grupo que consiste em adriamicina, cisplatina, taxol, doxorubicina, topotecan, fluorpirimidina, oxaliplatina e irinotecan.

[00032] Em algumas modalidades da invenção, o indivíduo progrediu durante ou acompanhando o regime de tratamento anterior. Em outras modalidades, o indivíduo progrediu depois do dito tratamento anterior.

[00033] O câncer pode ser resistente ou parcialmente resistente ao regime de tratamento anterior.

[00034] Em um aspecto adicional, a invenção refere-se a uma

composição de anticorpo para uso em um método de tratamento de câncer, em que o dito câncer é resistente ou parcialmente resistente ao tratamento com pelo menos outro anticorpo anti-EGFR selecionado do grupo que consiste em Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses; a dita composição de anticorpo compreendendo pelo menos duas moléculas distintas de anticorpo anti-EGFR,

a. em que uma primeira molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 109 de SEQ ID NO:72) e VH (aminoácidos 3 a 124 de SEQ ID NO:40) do anticorpo 992, um anticorpo que possua as CDR3s do anticorpo 992 (SEQ ID NO:116 e 111), um anticorpo que se ligue ao mesmo epítopo como o anticorpo 992 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 992 a EGFR humano; e

b. em que uma segunda molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 114 de SEQ ID NO:73) e VH (aminoácidos 3 a 120 de SEQ ID NO:41) do anticorpo 1024, um anticorpo que possua as CDR3s do anticorpo 1024 (SEQ ID NO:120 e 114), um anticorpo que se ligue ao mesmo epítopo como o anticorpo 1024 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1024 a EGFR humano.

[00035] De acordo com esse aspecto, a composição pode ser usada para terapia de primeira linha.

[00036] Em outras modalidades desse aspecto, a composição é usada como terapia de segunda linha acompanhando um regime de tratamento que envolve a quimioterapia e/ou pelo menos um dos inibidores de tirosina quinase e/ou pelo menos um inibidor da

angiogênese e/ou pelo menos um hormônio e/ou pelo menos um agente indutor da diferenciação. A composição também pode ser usada como terapia de terceira linha.

[00037] A composição pode ser usada como terapia de combinação junto com a quimioterapia e/ou pelo menos um dos inibidores de tirosina quinase e/ou pelo menos um inibidor da angiogênese e/ou pelo menos um hormônio e/ou pelo menos um agente indutor da diferenciação.

[00038] Em algumas modalidades, a composição é usada como terapia adjuvante depois da cirurgia e/ou da terapia de radiação.

[00039] A resistência completa ou parcial é determinada preferivelmente pelo ensaio de uma amostra de células de câncer isoladas do dito indivíduo. Esse ensaio pode incluir medir a ligação de Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e de anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses à células de câncer do dito indivíduo. A ausência de ligação indica resistência ao anticorpo. Alternativamente, a resistência parcial ou completa pode ser determinada em um ensaio de proliferação similar ao ensaio do Exemplo 21.

[00040] Em aspectos adicionais relacionados, a invenção refere-se a

- um método de redução da sinalização de EGFR,
- um método para destruir as células que expressam EGFR,
- um método para induzir apoptose em células que expressam EGFR,
- um método de inibir a proliferação de células que expressam EGFR,
- um método para induzir a diferenciação de células tumorais *in vivo*, e

- um método para induzir a internalização de EGFR,  
os ditos métodos compreendendo administrar uma composição de anticorpo para uma composição de células que expressam EGFR, as ditas células tendo sido previamente submetidas a um anticorpo anti-EGFR selecionado do grupo que consiste em Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e de anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses, a dita composição de anticorpo sendo como descrita no presente pedido.

[00041] Em outros aspectos adicionais, a invenção refere-se a

- um método de redução da sinalização de EGFR,
- um método para destruir as células que expressam EGFR,
- um método para induzir apoptose em células que expressam EGFR,
- um método de inibir a proliferação de células que expressam EGFR,
- um método para induzir a diferenciação de células tumorais *in vivo*, e
- um método para induzir a internalização de EGFR,  
os ditos métodos compreendendo administrar uma composição de anticorpo para uma composição de células que expressam EGFR, as ditas células sendo resistentes ou parcialmente resistentes a um anticorpo anti-EGFR selecionado do grupo que consiste em Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb806, Matuzumab e de anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses, a dita composição de anticorpo sendo como descrita no presente pedido.

[00042] Para esses aspectos da invenção, a composição de anticorpo da invenção pode ser qualquer uma das composições aqui descritas. Preferivelmente, a composição de anticorpo da invenção é

como descrita na seção com o título *Composição de anticorpo preferida*, isto é, uma composição baseada nos anticorpos 1024 e 992 como aqui descrita.

#### *Definições*

[00043] A expressão "anticorpo" define um componente funcional do soro e é geralmente referida tanto como uma coleção de moléculas (anticorpos ou imunoglobulinas) quanto como uma molécula (a molécula de anticorpo ou molécula de imunoglobulina). Uma molécula de anticorpo é capaz de se ligar ou de reagir com um determinante antigênico específico (o antígeno ou o epítopo antigênico), que por sua vez pode levar a indução de mecanismos efetores imunológicos. Uma molécula de anticorpo individual é geralmente conceituada como mono-específica e uma composição de moléculas de anticorpo pode ser monoclonal (isto é, consistindo em moléculas de anticorpo idênticas) ou policlonal (isto é, consistindo em duas ou mais moléculas de anticorpo diferentes que reagem com o mesmo ou com epítópos diferentes sobre o mesmo antígeno ou até sobre抗ígenos distintos, diferentes). Cada molécula de anticorpo tem uma estrutura única que a capacita se ligar especificamente a seu antígeno correspondente e todas as moléculas de anticorpo natural têm a mesma estrutura básica global de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Os anticorpos também são conhecidos coletivamente como imunoglobulinas. As expressões anticorpo ou anticorpos como usadas aqui, também são pretendidas incluir anticorpos quiméricos e de cadeia simples, assim como fragmentos de ligação de anticorpos, tais como Fab, fragmentos Fv ou fragmentos scFv, assim como formas multiméricas tais como moléculas diméricas de IgA ou de IgM pentavalente. Um anticorpo pode ser humano, de murino, quimérico, humanizado ou reformulado.

[00044] A expressão "par codificador cognato de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>" descreve

um par original de sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  contidas dentro ou derivadas da mesma célula que produz anticorpo. Portanto, um par cognato de  $V_H$  e  $V_L$  representa o pareamento de  $V_H$  e  $V_L$  originalmente presente no doador, a partir do qual a célula é derivada. A expressão "um anticorpo expresso a partir de um par codificador de  $V_H$  e  $V_L$ " indica que um anticorpo ou fragmento de anticorpo é produzido a partir de um vetor, plasmídeo ou similar contendo a sequência codificadora de  $V_H$  e  $V_L$ . Quando um par codificador cognato de  $V_H$  e  $V_L$  é expresso, tanto como um anticorpo completo quanto como um fragmento estável desse, ele preserva a afinidade de ligação e a especificidade do anticorpo originalmente expresso a partir da célula da qual ele é derivado. Uma biblioteca de pares cognatos também é denominada como um repertório ou coleção de pares cognatos e podem ser mantidos individualmente ou agrupados.

[00045] A expressão "CDR" – região determinante de complementaridade – é como definida em Lefranc *et al* (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp. Immunol 27, 55-77.

[00046] A expressão "um membro distinto de uma proteína policlonal recombinante" designa uma molécula de proteína de uma composição de proteína que compreende moléculas de proteína diferentes, porém homólogas, onde cada molécula de proteína é homóloga a outras moléculas da composição, mas também contém uma ou mais segmentos de sequência variável de polipeptídeo, que é/são caracterizada(s) pelas diferenças na sequência de aminoácidos entre membros individuais da proteína policlonal.

[00047] A expressão "promotores cabeça-cabeça" refere-se a um par de promotores colocados em íntima proximidade, tal que a transcrição de dois fragmentos de gene pelos promotores ocorre em

direções opostas. Um promotor cabeça-cabeça também pode ser construído com uma carga composta de ácidos nucleicos irrelevantes entre os dois promotores. Tal fragmento de carga pode conter facilmente mais do que 500 nucleotídeos. Promotores cabeça-cabeça também podem ser denominados promotores bidirecionais.

[00048] A expressão "imunoglobulina" é usada comumente como uma designação coletiva da mistura de anticorpos encontrados no sangue ou no soro, mas também pode ser usada para designar uma mistura de anticorpos derivados de outras fontes.

[00049] A expressão "molécula de imunoglobulina" designa uma molécula de anticorpo individual, por exemplo, como sendo parte de uma imunoglobulina ou parte de qualquer composição de anticorpo policlonal ou monoclonal.

[00050] A expressão "uma biblioteca de moléculas variantes de ácido nucleico de interesse" é usada para descrever a coleção de moléculas de ácido nucleico que coletivamente codifica uma "proteína policlonal recombinante de interesse". Quando usada para a transfecção, a biblioteca de moléculas variantes de ácido nucleico de interesse está contida em uma biblioteca de vetores de expressão. Tal biblioteca tipicamente terá pelo menos 2, 3, 5, 10, 20, 50, 1000,  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $10^6$  membros distintos.

[00051] A expressão "transferência em massa" é usada para descrever a transferência de sequências de ácido nucleico de interesse de uma população de vetores para outra população de vetores e fazendo isso para cada DNA simultaneamente sem recorrer ao isolamento dos DNAs individuais de interesse. Tais populações de vetores podem ser bibliotecas que contêm, por exemplo, regiões variáveis, promotores, líderes ou elementos intensificadores de interesse. Essas sequências podem ser então transferidas sem isolamento prévio, por exemplo, de um vetor de fago para um vetor de

expressão de mamífero. Especialmente para sequências de anticorpo, essa técnica garante que a ligação entre a diversidade de  $V_H$  e  $V_L$  não seja perdida enquanto se transfere bibliotecas, por exemplo, de um vetor de seleção (por exemplo, um vetor de apresentação em fago) para um vetor de expressão em mamífero. Dessa maneira, o pareamento original de  $V_H$  e  $V_L$  é mantido.

[00052] Como usada aqui, a expressão "operativamente ligada" refere-se a um segmento a ser ligado a outro segmento quando colocado em um relacionamento funcional com o outro segmento. Por exemplo, o DNA que codifica uma sequência de sinal está operativamente ligado ao DNA que codifica um polipeptídeo, se ele é expresso como um líder que participa da transferência do polipeptídeo para o retículo endoplasmático. Um promotor ou intensificador também estão operativamente ligados a uma sequência codificadora se eles estimularem a transcrição da sequência.

[00053] A expressão "anticorpo policlonal" descreve uma composição de moléculas de anticorpos diferentes que é capaz de se ligar ou reagir com vários determinantes antigênicos específicos diferentes sobre o mesmo ou sobre抗ígenos diferentes. Geralmente, a variabilidade de um anticorpo policlonal é considerada estar localizada nas assim chamadas regiões variáveis do anticorpo policlonal. Entretanto, no contexto da presente invenção, a policlonalidade também pode ser compreendida como descrevendo diferenças entre as moléculas individuais de anticorpo que residem nas assim chamadas regiões constantes, por exemplo, como no caso de misturas de anticorpos que contêm dois ou mais isotipos de anticorpo, tais como os isotipos de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 humanas ou os isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA de murino. Para os propósitos da presente invenção, tal anticorpo policlonal também pode ser denominado como "uma composição de

anticorpo".

[00054] A expressão "epítopo" é comumente usada para descrever uma proporção de uma molécula maior ou uma parte de uma molécula maior (por exemplo, antígeno ou sítio antigênico) que possui atividade antigênica ou imunogênica em um animal, preferivelmente um mamífero, e mais preferivelmente em um humano. Um epítopo que possui atividade imunogênica é uma porção de uma molécula maior que desencadeia uma resposta de anticorpo em um animal. Um epítopo que possui atividade antigênica é uma porção de uma molécula maior a qual um anticorpo se liga imuno-especificamente como determinado por qualquer método bem conhecido na técnica, por exemplo, pelos imunoensaio aqui descritos. Epítopos antigênicos não precisam necessariamente ser imunogênicos. Um antígeno é uma substância a qual um anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga imuno-especificamente, por exemplo, uma toxina, vírus, bactérias, proteínas ou DNA. Um antígeno ou sítio antigênico geralmente tem mais do que um epítopo, a menos que ele seja muito pequeno e é geralmente capaz de estimular uma resposta imune. Os epítopos podem ser lineares ou conformacionais. Um epítopo linear consiste em cerca de 6 a 10 aminoácidos adjacentes sobre uma molécula de proteína que é reconhecido por um anticorpo. Em contraste, um epítopo conformacional consiste em aminoácidos que não estão arranjados sequencialmente. Aqui o anticorpo reconhece apenas a estrutura tridimensional. Quando uma molécula de proteína se enovelá em uma estrutura tridimensional, os aminoácidos que formam o epítopo são justapostos possibilitando ao anticorpo reconhecer a sequência. Em uma proteína desnaturada apenas o epítopo linear pode ser reconhecido. Um epítopo conformacional, por definição, deve estar no lado de fora da proteína enovelada. Um anticorpo que reconhece o epítopo conformacional pode se ligar apenas sob

procedimentos não desnaturantes, discretos. Os anticorpos que se ligam a diferentes epítopos sobre o mesmo antígeno podem ter efeitos variáveis sobre a atividade do antígeno que eles ligam, dependendo da localização do epítopo. Um anticorpo que se liga a um epítopo em um sítio ativo do antígeno pode bloquear a função do antígeno completamente, enquanto que outro anticorpo que se ligue a um epítopo diferente pode ter pouco ou nenhum efeito sobre a atividade do antígeno isolado. Tais anticorpos podem, entretanto, ainda ativar o complemento e dessa maneira resultar na eliminação do antígeno e podem resultar em efeitos sinérgicos quando combinados com um ou mais anticorpos que se ligam em diferentes epítopos sobre o mesmo antígeno. Na presente invenção, o epítopo é, preferivelmente, uma proporção do domínio extracelular de EGFR. Antígenos da presente invenção são preferivelmente domínios extracelulares de proteínas EGFR, polipeptídeos ou fragmentos dessas, aos quais um anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga imuno-especificamente. Um antígeno associado à EGFR também pode ser um análogo ou derivado do polipeptídeo ou fragmento de domínio extracelular de EGFR ao qual um anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga imuno-especificamente.

[00055] Anticorpos capazes de competir um com o outro pela ligação ao mesmo antígeno, podem se ligar ao mesmo ou a epítopos superpostos ou podem ter um sítio de ligação em íntima vizinhança um com o outro, tal que a competição é causada principalmente por impedimento estérico. Métodos para determinar a competição entre anticorpos estão descritos nos exemplos.

[00056] Como usada aqui, a expressão "proteína policlonal" ou "policlonalidade" refere-se a uma composição de proteína que comprehende moléculas de proteína diferentes, mas homólogas, selecionadas preferivelmente da superfamília de imunoglobulinas.

Portanto, cada molécula de proteína é homóloga a outras moléculas da composição, mas também contém uma ou mais segmentos de sequência variável de polipeptídeo, que é/são caracterizada(s) pelas diferenças nas sequências de aminoácidos entre membros individuais da proteína policlonal. Exemplos conhecidos de tais proteínas policlonais incluem anticorpos ou moléculas de imunoglobulina, receptores de célula T e receptores de célula B. Uma proteína policlonal pode consistir em um subgrupo definido de moléculas de proteína, que tenha sido definido por um aspecto comum tal como a atividade de ligação partilhada contra um alvo desejado, por exemplo, no caso de um anticorpo policlonal contra o antígeno alvo desejado.

[00057] Por "proteína" ou "polipeptídeo" entende-se qualquer cadeia de aminoácidos, sem levar em consideração a extensão ou a modificação pós-traducional. As proteínas podem existir como monômeros ou multímeros, que compreendem duas ou mais cadeias de polipeptídeos reunidas, fragmentos de proteínas, polipeptídeos, oligopeptídeos ou peptídeos.

[00058] A expressão "RFLP" refere-se a "polimorfismo de extensão de fragmento de restrição", um método através do qual o padrão migratório em gel de fragmentos de molécula de ácido nucleico é analisado depois da clivagem com enzimas de restrição.

[00059] A expressão "embaralhamento" descreve situações onde dois ou mais membros distintos de uma proteína policlonal compreendida por duas cadeias de polipeptídeos diferentes, por exemplo, da superfamília das imunoglobulinas, são expressos a partir de uma célula individual. Essa situação pode surgir quando a célula individual integrou no seu genoma mais do que um par de segmentos de gene, onde cada par de segmentos de gene codifica um membro distinto da proteína policlonal. Em tais situações, podem ser feitas combinações não pretendidas das cadeias de polipeptídeo expressas

a partir dos segmentos de gene. Essas combinações não pretendidas de cadeias de polipeptídeo podem não ter qualquer efeito terapêutico.

[00060] A expressão "embaralhamento de cadeia  $V_H$  e  $V_L$ " é um exemplo do embaralhamento acima descrito. Nesse exemplo, segmentos de gene que codificam  $V_H$  e  $V_L$  constituem um par de segmentos de gene. O embaralhamento ocorre quando combinações não pretendidas de polipeptídeos de  $V_H$  e  $V_L$  são produzidas a partir de uma célula onde dois pares de segmento de gene que codificam  $V_H$  e  $V_L$  diferentes estão integrados na mesma célula. Tal molécula de anticorpo embaralhada não retém, provavelmente, a especificidade original e, portanto, não deve ter qualquer efeito terapêutico.

[00061] A expressão "transfecção" é usada aqui como uma expressão ampla para a introdução de DNA estranho em uma célula. A expressão também pretende cobrir outros métodos funcionais equivalentes para a introdução de um DNA estranho em uma célula, tal como, por exemplo, a transformação, infecção, transdução ou fusão de uma célula doadora e uma célula aceptora.

[00062] As expressões "sequência variável de polipeptídeo" e "região variável" são usadas alternativamente.

[00063] A expressão "epítopos distintos" significa que quando dois anticorpos diferentes se ligam a epítopos distintos, há menos do que 100% de competição pela ligação ao antígeno, preferivelmente menos do que 50% de competição pela ligação ao antígeno, mais preferivelmente essencialmente nenhuma competição pela ligação ao antígeno. Uma análise de "epítopos distintos" de pares de anticorpo é determinada tipicamente pelos experimentos de ligação sob condições de saturação de anticorpo tanto pela análise FACS sobre células que expressam EGFR e anticorpos fluorescentes marcados individualmente, quanto pela Ressonância de Plasma de superfície usando抗ígenos EGFR capturados ou conjugados a uma superfície

celular flutuante como descrito nos exemplos.

[00064] A expressão ser capaz de "inibir a ligação a EGF" quando aplicada a uma molécula de anticorpo significa que a molécula de anticorpo exibe um valor de IC<sub>50</sub> com relação à ligação de EGF com EGFR menor do que 10 nM, preferivelmente menor do que 8 nM, mais preferivelmente menor do que 7 nM, mais preferivelmente menor do que 5 nM, mais preferivelmente menor do que 4 nM, mais preferivelmente menor do que 3 nM, mais preferivelmente menor do que 2 nM, mais preferivelmente menor do que 1 nM.

[00065] As expressões "receptor do fator de crescimento epidérmico", "EGFR" e "antígeno EGFR" são usadas aqui alternativamente e incluem variantes, isoformas e espécies homólogas de EGFR humano. Em uma modalidade preferida, a ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno de EGFR inibe o crescimento de células que expressam EGFR (por exemplo, uma célula de tumor) pela inibição ou pelo bloqueio da ligação do ligante de EGFR a EGFR. A expressão "ligante de EGFR" abrange todos os ligantes (por exemplo, fisiológicos) para EGFR, incluindo mas não limitados a EGF, TNF-alfa, EGF que se liga a heparina (HB-EGF), anfiregulina (AR), heregulina, beta-celulina e epiregulina (EPI). Em outra modalidade preferida, a ligação de um anticorpo da invenção ao antígeno de EGFR media a fagocitose da célula efetora e/ou a morte das células que expressam EGFR.

[00066] Estrutura do domínio de EGFR: A parte extracelular de EGFR maduro (SwissProt acc.#P00533) consiste em 621 aminoácidos e quatro domínios de receptor: Domínio I abrange os resíduos 1 a 165, domínio II, resíduos 166 a 312, domínio III, resíduos 313 a 481 e domínio IV, resíduos 482 a 612 (Cochran *et al.* 2004, J. Immunol Methods 287, 147:158). Os domínios I e III foram sugeridos contribuir para a formação de sítios de ligação de alta afinidade para ligantes. Os

domínios II e IV são ricos em cisteína, regiões semelhantes à laminina que estabilizam o enovelamento da proteína e contêm uma possível interface de dimerização de EGFR.

[00067] Como usada aqui, a expressão "inibe o crescimento" (por exemplo referindo-se a células) é pretendida incluir qualquer diminuição mensurável na proliferação (aumento no número de células) ou no metabolismo de uma célula quando contatada com um anticorpo anti-EGFR quando comparado com o crescimento das mesmas células sem contato com um anticorpo anti-EGFR, por exemplo, a inibição do crescimento de uma cultura de célula em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

[00068] Como usadas aqui, as expressões "inibe a ligação" e "bloqueia a ligação" (por exemplo, referindo-se a inibição/bloqueio da ligação de EGFR ao ligante de EGFR) são usadas alternativamente e abrangem ambas a inibição /bloqueio parcial e completo. A inibição/bloqueio do ligante de EGFR a EGFR preferivelmente reduz ou altera o nível normal ou o tipo de sinalização celular que ocorre quando o ligante de EGFR se liga a EGFR sem inibição ou bloqueio. A inibição e o bloqueio também são pretendidos incluir qualquer diminuição mensurável na afinidade de ligação do ligante de EGFR a EGFR quando em contato com um anticorpo anti-EGFR quando comparado com o ligante sem contato com um anticorpo anti-EGFR, por exemplo, o bloqueio de ligantes de EGFR a EGFR em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

[00069] A expressão "anticorpo recombinante" é usada para descrever uma molécula de anticorpo ou várias moléculas que é/são expressa(s) a partir de uma célula ou linhagem celular transfectada com um vetor de expressão que compreende a sequência codificadora

do anticorpo que não está naturalmente associada com a célula.

[00070] Cancer – O câncer (expressão médica: neoplasia maligna) é uma classe de doenças na qual um grupo de células exibe um crescimento descontrolado (divisão além dos limites normais), invasão (intrusão e destruição de tecidos adjacentes) e, algumas vezes, metástase (disseminação para outras localizações no corpo através de linfa ou do sangue). Essas três propriedades malignas de cânceres diferenciam-nos dos tumores benignos, que são *autolimitados*, não invadem ou metastatizam. A maioria dos cânceres forma um tumor, mas alguns, como a leucemia, não o faz. O câncer também pode ser denominado como crescimento neoplásico e distúrbios hiperproliferativos.

[00071] Terapia adjuvante: Tratamento dado depois do tratamento primário para aumentar as chances de uma cura. Terapia adjuvante pode incluir a quimioterapia, terapia com radiação, terapia com hormônios ou a terapia biológica.

[00072] Quimioterapia: Tratamento com fármacos de moléculas pequenas.

[00073] Terapia de radiação: Tratamento com radiação.

[00074] Terapia de primeira linha: O primeiro tratamento para uma doença ou condição. Em pacientes com câncer, a terapia de primeira linha pode ser a cirurgia, a quimioterapia, terapia com radiação, terapia com anticorpo ou uma combinação dessas terapias. Também chamada de terapia primária e tratamento primário.

[00075] Terapia de segunda linha: Tratamento que é dado quando o tratamento inicial (terapia de primeira linha) não funciona ou para de funcionar.

[00076] Terapia de terceira linha: Tratamento dado quando a terapia de segunda linha não funciona ou para de funcionar.

TKIs – Inibidores de tirosina quinase

[00077] Progressão: Em medicina, o curso de uma doença, tal como o câncer, conforme ela se torna pior ou se dissemina pelo corpo.

[00078] Cancer resistente: Cancer que não responde ao tratamento. O câncer pode ser resistente no início do tratamento ou ele pode se tornar resistente durante o tratamento. Também chamado de câncer refratário. Em contraste com isso, um tratamento eficaz pode induzir à erradicação do tumor.

[00079] Cancer parcialmente resistente: Um câncer parcialmente resistente responde ao tratamento, mas o tratamento não causa a erradicação do tumor. Em um câncer parcialmente resistente, o crescimento do tumor pode ser inibido parcialmente ou completamente, mas o tumor não regide ou regide apenas insignificantemente.

[00080] A resistência ou resistência parcial a um anticorpo anti-EGFR selecionado do grupo que consiste em Cetuximab, panitumumab, Zalutumumab, nimotuzumab, ICR62, mAb425, Matuzumab e anticorpos capazes de se ligar ao mesmo epítopo como qualquer um desses, pode ser observada em um paciente que recebe um ou mais anticorpos ou ser medida em um ensaio *in vitro*, por exemplo, pela determinação da expressão de EGFR e não ligação ou ligação fraca do anticorpo monoclonal ou em um ensaio de proliferação tal como descrito no Exemplo 21.

#### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00081] Figura 1: Classificação de esplenócitos (para detalhes veja o Exemplo 1). As seguintes entradas são feitas (ilustradas):

- Entrada 1: Células vivas (gráfico FSC/Iodeto de Propídeo). (Painel inferior esquerdo)
- Entrada 2: Células plasmáticas são bloqueadas como CD43 pos./CD138 pos. (painel inferior direito)
- Entrada 3: discriminação dupla (painel superior direito)

[00082] *figura 2:* Murino-mSymplex™ PCR. RT-PCR de extensão de superposição multiplex para amplificação e ligação cognata de genes de cadeia pesada e leve de anticorpo a partir de uma única célula. Para detalhes, consulte o Exemplo 1.

[00083] *figura 3:* Repertório de clonagem de murino. Uma associação de produtos de PCR mSymplex™ codificando pares de genes de VH/VL de células plasmáticas isoladas foram unidos ao gene que codifica a cadeia leve kappa constante humana pela junção ("splicing") por extensão de superposição. A associação de genes, codificando anticorpos quiméricos de humano-camundongo foi inserido em um vetor de expressão seguido pela inserção de um cassete de promotor bidirecional (2xCMV).

[00084] *figura 4:* Representação esquemática do vetor de expressão 00-VP-002 de anticorpo de extensão completa de mamífero. Amp e Amp pro, gene de resistência a ampicilina e seu promotor; origem pUC, origem de replicação pUC; CMV, promotor de mamífero que dirige a expressão da cadeia leve e da cadeia pesada; Líder IGHV, líder da cadeia pesada genômica humana; carga de H ("H stuffer"), inserto que é trocado pela sequência que codifica a região variável da cadeia pesada; IGHG1, sequência codificadora para região constante da cadeia pesada genômica da imunoglobulina do isotipo G1 (sequência é mostrada no Apêndice 2); B-globina A de coelho, sequência poli A de beta-globina de coelho; Líder IGKV, líder kappa de murino; stuffer L, inserto que é trocado pela sequência que codifica a cadeia leve; term SV40, sequência terminadora de vírus 40 de símio; FRT, sítio-alvo de reconhecimento de Flp; Neo, gene de resistência à neomicina; SV40 poli A, sequência de sinal de poli A do vírus 40 de símio.

[00085] *figura 5:* Análise em grupo da diferença de absorbância a 450-620 nm. Sobrenadantes são agrupados pela reatividade como

indicado pelo número (1 a 4) que acompanha o nº do clone. Cinza escuro indica uma diminuição no número de células metabolicamente ativas, enquanto que cinza claro indica um aumento no número de células metabolicamente ativas. Preto indica sobrenadantes sem efeito sobre o número de células metabolicamente ativas.

[00086] *figura 6:* Grau de inibição de anticorpos anti-EGFR com os anticorpos de *referência* listados direcionados contra domínios de EGFR específicos como determinado em um ELISA de competição. A) Cálculo da inibição. B) Classificação da inibição como se segue: 25-49%: competição moderada (+); 50-74%: competição acentuada (++) ; 75-100%: competição muito acentuada (+++). As caixas que exibem inibição significativa (50-100%) estão sombreadas de cinza. Erbitux e Vectibix são mostrados em duplicata (quatro experimentos independentes) para ilustrar a reproduzibilidade do ensaio. Ab2 (225) é o precursor de murino que leva a Erbitux.

[00087] *figura 7:* Ilustração de um ciclo de mapeamento de epítopo realizado na máquina Biacore 3000 SPR, onde um mAb de amostra compete pela ligação ao domínio extracelular de EGFR com quatro anticorpos de *referência* diferentes.

[00088] *figura 8:* Grau de inibição de anticorpos anti-EGFR com os anticorpos de *referência* listados direcionados contra domínios de EGFR específicos como determinado pela análise de competição com a tecnologia SPR. A) Cálculo da inibição. B) Classificação da inibição como se segue: 25-49%: competição moderada (+); 50-74%: competição acentuada (++) ; 75-100%: competição muito acentuada (+++). As células que exibem inibição significativa (50-100%) estão sombreadas de cinza. Clone 1229 marcado com \* não se ligou no ensaio Biacore.

[00089] *figura 9:* Determinação de grupos de epítópos dentro do repertório de anticorpo anti-EGFR pela análise de competição SPR de

pares de anticorpo anti-EGFR. Os anticorpos são agrupados de acordo com o reconhecimento presumido do domínio de EGFR. Células nas quais as combinações de anticorpo foram encontradas se ligar a epítopos superpostos, resultando em mais do que 50% de inibição, estão sombreadas em cinza. Células nas quais as determinações não foram feitas estão coloridas em preto. A) Cálculo da inibição. B) Classificação da inibição como se segue: 25-49%: competição moderada (+); 50-74%: competição acentuada (++) ; 75-100%: competição muito acentuada (+++).

[00090] *figura 10:* Mapas de epítopo de anticorpos de *referência* e anticorpos anti-EGFR direcionados contra o domínio extracelular de EGFR como determinado pela análise Biacore. A) Mapa de epítopo de anticorpos direcionados contra o domínio I ou o domínio I/II do Domínio Extracelular de EGFR (ECD). B) Mapa de epítopo de anticorpos direcionados contra o domínio III de ECD de EGFR.

[00091] *figura 11:* Investigação da ligação simultânea de uma mistura oligoclonal de anticorpos direcionados contra epítopos não superpostos sobre EGFR. A) Adição sequencial de anticorpos contra o domínio III, domínio I ou de especificidade desconhecida. Valores de inibição de mAbs isolados de amostra testados contra diferentes misturas de mAb ou mAb isolado são mostrados em caixas sombreadas. Os valores de Ru max usados para calcular a inibição também são mostrados. B) Análise de competição de seis mAbs de amostra distintos direcionados contra epítopos não superpostos sobre EGFR e uma mistura de anticorpo contendo os seis anticorpos testados. As misturas de anticorpo onde o anticorpo de amostra testado não foi incluído serviu como um controle positivo. Os valores de inibição de mAbs isolados de amostra testados contra diferentes misturas de mAb são mostrados em caixas sombreadas. Os valores de Ru max usados para calcular a inibição também são mostrados. C)

Sensogramas correspondentes da análise em B que ilustram o bloqueio de anticorpo e, em alguns casos, a intensificação da ligação do anticorpo. D) Teste de anticorpos adicionais direcionados contra o domínio I, I/II e de especificidade desconhecida contra a mistura de seis mAb.

[00092] *figura 12:* Determinação do bloqueio do ligante de EGF mediado por anticorpo pela titulação de anticorpo sobre EGFR de extensão completa e detecção da ligação de ligante de EGF biotinilado com um reagente de estreptavidina HRP. Erbitux, Vectibix e IgG Synagis (palivizumab) foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Depois do bloqueio do epitopo de anticorpo reconhecido com anticorpos testados, o grau de competição pelo ligante de EGF foi visualizado pela adição de 0,1 µg/mL de ligante de EGF biotinilado e um conjugado secundário de estreptavidina-HRP para detecção.

[00093] *figura 13:* Efeito do pré-tratamento com os anticorpos indicados sobre EGF (50 ng/mL) induziu a fosforilação de EGFR em células HN5. Os anticorpos (10 µg/mL) como nomeados no gráfico foram incubados com as células por 30 min antes da adição de EGF por 7,5 minutos. Dados marcados com \* foram significativamente diferentes dos dados de controle ((-)ctrl) ( $p<0,05$ ). A. 1208 teve um efeito protetor significativo sobre a fosforilação de EGFR. B. 1277 e 1320 protegeram significativamente contra a fosforilação induzida de EGF. Barras de erro representam os desvios padrão de três experimentos independentes.

[00094] *figura 14:* Análise celular por western de EGFR fosforilado (pEGFR) e EGFR em células HN5. Mix significa a mistura equimolar de anticorpos 992, 1030 e 1042 até uma concentração final de 10 µg/mL, os outros anticorpos foram usados em uma concentração de 10 µg/mL cada. 50 µg/mL de EGF foram adicionados por 7,5 minutos

antes da fixação para estimular a fosforilação de EGFR. As barras de erro representam desvios-padrão de 6 (ctrl-) separados ou 3 pontos de dados (992, 1030, 1042 mix ou erbitux). 992, 1030, mix e erbitux tiveram um efeito protetor significativo (\* = p<0,05) sobre a fosforilação.

[00095] *figura 15:* O efeito da incubação de anticorpos sobre a internalização de EGFR. Os dados são mostrados como o percentual de receptores removidos da superfície celular em relação à coloração inicial. As barras de erro correspondem a SEM.

[00096] *figura 16:* Curvas de crescimento de células A431-NS na presença de concentrações variáveis dos anticorpos 992, 1030 e 1042 e suas misturas como medidas pelo percentual de células metabolicamente ativas quando comparadas ao controle não tratado. 1001 é um anticorpo não funcional com isotipo similar usado como controle negativo.

[00097] *figura 17:* Curvas de crescimento de células A431-NS na presença de 10 µg/mL dos anticorpos 992, 1030 e 1042 e suas misturas e concentrações variáveis do ligante EGF de EGFR medidas como absorbância a 450 nm. 1001 é um anticorpo não funcional com isotipo similar usado como controle negativo.

[00098] *figura 18:* Curvas de crescimento de células A431-NS na presença de concentrações variáveis de anticorpo 992 e misturas de 992 e anticorpos com epítópos não superpostos presentes no domínio I, II ou III. 1001 é um anticorpo não funcional com isotipo similar usado como controle negativo.

[00099] *figura 19:* Apoptose em células A431-NS. A mistura de EGFR, anticorpos monoclonais individuais, Erbitux e Vectibix foram testados em diluições de 10 vezes. O complexo de histona-DNA das células apoptóticas foi medido usando um kit de ELISA da Roche.

[00100] *figura 20:* Quatro grupos de camundongos nus Balb/C

Nu/Nu foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células A431-NS. Quando os tumores tinham aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , o tratamento foi iniciado. Os grupos foram inoculados com 1 mg/mL de anticorpos cinco vezes durante o experimento como indicado com as setas. Os diâmetros dos tumores foram medidos com calibradores digitais. Os resultados são mostrados como o volume médio do tumor (+/- SEM).

[000101] *figura 21:* Quando camundongos individuais foram sacrificados no experimento mostrado na *figura 21*, os tumores foram removidos e pesados. Os valores médios +/- SEM são mostrados. As estrelas indicam significância com  $P < 0,05$ .

[000102] *figura 22:* Crescimento de esferoides de A431-NS na presença de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos anticorpos 1001, Erbitux, Vectibix e uma mistura de três anticorpos com epítopos não superpostos 992+1030+1041. 1001 é um anticorpo não funcional com isotipo similar usado como controle negativo.

[000103] *figura 23:* Sequência de DNA (SEQ ID NO:100) e de proteína (SEQ ID NO:101) do domínio extracelular de EGFR de Cynomolgus clonadas a partir do cDNA derivado da epiderme da pele de macaco Cynomolgus.

[000104] *figura 24:* Alinhamento da sequência de proteína obtida de ECD de EGFR de Cynomolgus (SEQ ID NO:101) com ECD de EGFR humano (SEQ ID NO:108) obtida do GENBANK número de acesso X00588. Também é mostrada uma sequência de consenso (SEQ ID NO:109).

[000105] *figura 25:* Exemplo de ensaio ELISA para a discriminação entre anticorpos inter-reativos e específicos para a espécie que se ligam a ECD de EGFR de Humano ou Cynomolgus ou ambos.

[000106] *figura 26:* Microfotografias de seções representativas de tumores de cada um dos quatro grupos experimentais de camundongos xeno-enxertados. Em uma ampliação de 200x, as setas

apontam para focos de diferenciação terminal de células A431 *in vivo*. Nota-se os focos acentuadamente maiores e mais numerosos de diferenciação terminal no tumor tratado com uma mistura de três clones anti-EGFR (992+1030+1024), dois painéis superiores.

*figura 27:* A) Imagens feitas em uma amplificação de 40X de esferoides de HN5 24 horas depois da adição de 10 µg/mL do anticorpo de controle (Rituximab, anti-CD-20) ou mistura de anticorpo 992 e 1024 anti-EGFR. B) Quantificação da área coberta pelas células usando o programa Image J (\* p<0,01).

[000107] *figura 28:* Diagrama que mostra os níveis de Involucrina nos quatro grupos de tratamento como percentual do grupo de controle não tratado (\*#p<0,005 quando comparado com Erbitux, Vectibix e o grupo de controle Negativo, respectivamente).

[000108] *figura 29:* A) Imagens feitas com ampliações de 60 x de células HN5 e A431-NS incubadas com 10 µg/mL de Erbitux marcado com Alexa-488 ou 992+1024 por 2 horas. B) Imagens feitas com ampliações de 60 x com um pequeno orifício ("pin-hole") de células A431-NS incubadas com 10 µg/mL de Erbitux marcado com Alexa-488 ou 992+1024 por 2 horas.

[000109] *figura 30:* A) Imagens feitas com ampliações de 60 x de células HN5 incubadas com 10 µg/mL de Erbitux marcado com Alexa-488 ou 992+1024 pelos períodos de tempo indicados.

[000110] *figura 31:* Determinação da especificidade de apresentação de antígeno de Fabs 992, 1024 & 1030 pelas titulações seriadas de anticorpo sobre células A431-NS e EGFR de extensão completa purificado em ELISA. Os anticorpos Fab ligados foram visualizados pelo conjugado secundário de Fab anti-humano específico de cabra – HRP. A) Anticorpos Fab testados contra EGFR de extensão completa purificado de células A431. B) Anticorpos Fab testados contra EGFR expresso sobre a superfície de células A431-NS.

[000111] *figura 32:* Determinação da afinidade funcional de IgG e fragmentos Fab de anticorpos 992, 1024, 1030, Erbitux e Vectibix pela titulação seriada em células A431-NS fixadas com paraformaldeído em ELISA. Anticorpos Fab e IgG ligados foram visualizados por um conjugado secundário de Fab anti-humano específico de cabra – HRP. O anticorpo Synagis anti-RSV de proteína F foi empregado como um controle negativo e não mostrou qualquer ligação no ensaio Elisa empregado. A) Ligação funcional de anticorpos IgG a células A431-NS. B) Ligação funcional de anticorpos Fab a células A431-NS.

[000112] *figura 33:* Determinação da intensificação da ligação de IgG a EGFR sobre células A431-NS antes da saturação do receptor com fragmentos Fab que se ligam a epítópos não superpostos. Os fragmentos Fab indicados foram deixados saturar o epítopo de EGFR reconhecido sobre células A431-NS por 30 minutos, depois do que os anticorpos foram titulados seriadamente e IgG ligada com ou sem a adição de Fab visualizada por um conjugado secundário de camundongo anti-Fc humano-HRP. A) Características de ligação de IgG 992 a células A431-NS com ou sem a saturação prévia do receptor com os fragmentos Fab indicados. B) Características de ligação de IgG 1024 a células A431-NS com ou sem a saturação prévia do receptor com os fragmentos Fab indicados. C) Características de ligação de IgG 1030 a células A431-NS com ou sem a saturação prévia do receptor com os fragmentos Fab indicados.

[000113] *figura 34:* cDNA de EGFR de extensão completa de cynomolgus (*figura 34A;* SEQ ID NO:102) e a proteína codificada (*figura 34B;* SEQ ID NO:103).

[000114] *figura 35:* Apoptose obtida em A431-NS com 1 µg/mL dos anticorpos/composições indicadas. Complexos de histona-DNA foram detectados em um kit ELISA da Roche. Os níveis de apoptose estavam relacionados a um controle positivo (apoptose máxima).

[000115] *figura 36:* Camundongos Balb/C nu/nu foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células A431-NS. Quando os tumores tinham aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , em média, o tratamento foi iniciado. Os camundongos receberam 17 injeções com o anticorpo. O primeiro tratamento começou no dia 8 e o último no dia 34. Anticorpo/composições foram injetados a 0,5 mg/dose ou 0,17 mg/dose. Os valores médios do volume do tumor +/- SEM são mostrados.

[000116] *figura 37:* Inibição da proliferação de A431-NS. O eixo de X mostra combinações representativas diferentes de 3 anticorpos da invenção. O eixo de Y mostra a atividade metabólica como um percentual do controle não tratado (controle). Barras de erro representam +/- SEM. Para detalhes adicionais veja o Exemplo 6.

[000117] *figura 38:* Efeito inibitório do crescimento de duas doses diferentes da mistura de 992+1024 comparado com Erbitux em xenoxertos de A431-NS de tumor humano. Camundongos Balb/C nu/nu foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células A431-NS. Quando os tumores tinham aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$  (dia 8), em média, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 9 grupos e o tratamento foi iniciado. Os anticorpos indicados foram injetados a 0,5 mg/dose ou 1 mg/dose, duas vezes por semana para um total de 9 injeções. A área cinza clara do gráfico indica o período de tratamento. O início da linha pontilhada designa o momento no qual o primeiro camundongo em um dado grupo foi sacrificado devido ao tamanho excessivo do tumor. As diferenças estatisticamente significativas entre 2mg/semana de 992+1024 vs. 2mg/semana de Erbitux e 1mg/semana de 992+1024 vs 2mg/semana de Erbitux foram calculadas no dia 60 onde todos, exceto o grupo 2mg/semana de 992+1024, foram finalizados. O tamanho do tumor dos animais excluídos antes do dia 60 foi, portanto, transportado; o gráfico mostra o volume acumulado do

tumor de todos os camundongos em um dado grupo. Valores médios +/- SEM são mostrados.

[000118] *figura 39:* Gráfico de Kaplan-Meyer da sobrevida de camundongos tratados com a mistura de anticorpo 992 + 1024, Erbitux ou anticorpo de controle (mesmo experimento como mostrado na *figura 38*). Resultados apresentados como percentual de sobrevida de camundongos tratados. Uma diferença significativa entre o percentual de sobrevida dos camundongos dos grupos com dose alta (2 mg/semana, P = 0,0008) e dose baixa (1 mg/semana, P = 0,0004) foi observada quando se compara 992+1024 e Erbitux. A dose baixa de 992+1024 também foi significativamente melhor quando comparada com a dose alta de Erbitux (P = 0,0087). A diferença estatística foi calculada usando um teste Log-rank (Mantel-Cox).

[000119] *figura 40:* Análise da reatividade cruzada de IgGs 992, 1024 e 1320 contra células CHO transfetadas com EGFR de extensão completa de Humano e Cynomolgus pela análise FACS. O anticorpo ligado foi detectado com um F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG FC humana marcado com PE. O bloqueio foi realizado em células uniformes (propriedades SCC/FCS) que expressam EGFR. A ligação é expressa como % máximo de ligação de anticorpo em uma concentração de 1 nM.

[000120] *figura 41:* Alinhamento Clustaw2 das sequências de aminoácidos das regiões variáveis das candidatas a região variável de murino (chi) e humanizada (hu) de ambas as cadeias pesada e leve de 992 (A) e 1024 (B). As regiões de CDR como definidas por IMGT estão sublinhadas; as lacunas apresentadas por (-), aminoácidos idênticos por (\*), mutações conservativas como (:), semiconservativas (.). Os aminoácidos em negrito indicam as posições de aminoácidos onde mutações de volta para o resíduo original identificado serão realizadas se as variantes estruturais totalmente humanizadas apresentarem

afinidade de ligação diminuída. Os números das ID das sequências são os seguintes: VH humanizada de 992 (SEQ ID NO:104). VL humanizada de 992 (SEQ ID NO:105). VH humanizada de 1024 (SEQ ID NO:106). VL humanizada de 1024 (SEQ ID NO:107). VH quimérica de 992 (aa 3 a 124 de SEQ ID NO:40). VL quimérica de 992 (aa 3 a 109 de SEQ ID NO:72). VH quimérica de 1024 (aa 3 a 120 de SEQ ID NO:41). VL quimérica de 1024 (aa 3 a 114 de SEQ ID NO:73).

[000121] *figura 42A:* Representação esquemática dos genes que codificam o domínio variável duplo para 992L1024; 992L1024 IGHV (751bp) é representado a partir do sítio de restrição 5' Ascl seguido por 992 IGHV, o ligante ASTKGP, 1024 IGHV e terminando no sítio de restrição 3' Xhol, 992L1024 IGKV (1071bp) é representado a partir do sítio de restrição 5' Nhel seguido por 992 IGKV, o ligante TVAAP, 1024 IGKV, IGKC e terminando no sítio de restrição 3' Notl.

[000122] *figura 42B:* Representação esquemática dos genes que codificam o domínio variável duplo para 1024L992; 1024L992 IGHV (751bp) é representado a partir do sítio de restrição 5' Ascl seguido por 1024 IGHV, o ligante ASTKGP, 992 IGHV e terminando no sítio de restrição 3' Xhol, 1024L992 IGKV (1071bp) é representado a partir do sítio de restrição 5' Nhel seguido por 1024 IGKV, o ligante TVAAP, 992 IGKV, IGKC e terminando no sítio de restrição 3' Notl.

[000123] *figura 43:* Atividade metabólica de células HN5wt em FBS 0,5% (Em cima) e células HN5 resistentes a Erbitux (embaixo) na presença de concentrações variáveis dos anticorpos indicados. Legenda: anticorpos 992 e 1024 são como definidos no presente pedido, Sym004 é uma composição de anticorpo com os anticorpos 992 e 1024.

[000124] *figura 44:* Curvas de crescimento de tumor de tumores individuais de A431-NS depois do tratamento inicial com 1 mg de uma composição de anticorpo com os anticorpos 992 + 1024 para um total

de nove injeções (caixa cinza à esquerda). Todos os tumores responderam a terapia, mas mais de 80 dias depois do tratamento, três dos tumores voltaram a crescer de novo. O retratamento desses tumores com uma composição de anticorpo com os anticorpos 992 + 1024 induziu a regressão do tumor (caixas cinza à direita).

[000125] *figura 45:* Camundongos BALB/C nu/nu com tumores xeno-enxertados de A431-NS foram pré-tratados com Erbitux e subsequentemente divididos aleatoriamente para continuar o tratamento com Erbitux ou mudados para o tratamento com uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024 (Sym004 na legenda da *figura* ), quando os tumores tinham um tamanho médio de aproximadamente 500 mm<sup>3</sup>. Um peso significativamente diminuído do tumor foi visto no grupo que foi mudado para o tratamento com uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024 quando comparado com o grupo que continuou o tratamento com Erbitux.

[000126] *figura 46:* Atividade metabólica de clones de HN5 resistentes a Erbitux em FBS 0,5% na presença de concentrações variáveis dos anticorpos indicados.

[000127] *figura 47:* Crescimento de xeno-enxertos de tumor no clone #7 de HN5 resistente a Erbitux tratado com 50 mg/kg de Sym004 ou Erbitux. O erro padrão da média está indicado no gráfico.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### Misturas de anticorpo

[000128] A invenção refere-se a uma composição de anticorpo para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo que tenha sido submetido a um regime de tratamento anterior envolvendo um anticorpo anti-EGFR humano ou no qual o dito câncer é resistente ou parcialmente resistente ao tratamento com pelo menos um outro anticorpo anti-EGFR, a dita composição de anticorpo compreendendo pelo menos duas moléculas distintas de anticorpo anti-EGFR, Na

presente invenção, os pelo menos dois anticorpos distintos anti-EGFR humano se ligam a epítopos não superpostos. A natureza de não superposição dos anticorpos é determinada preferivelmente usando anticorpos diferencialmente marcados em uma análise FACS com células que expressam EGFR ou pelo uso da Ressonância de Plasma de Superfície usando o antígeno EGFR capturado ou conjugado a uma superfície de fluxo celular. Os métodos baseados em ELISA como descrito nos exemplos também podem ser usados. Uma composição que se ligue a dois ou mais epítopos de EGFR não superpostos pode ser usada contra uma ampla faixa de tipos de câncer dependentes de EGFR já que ela pode ser menos vulnerável à diferenças na conformação de EGFR e menos vulneráveis a mutações, comparada com uma composição de anticorpos monoclonais que atingem um ou dois epítopos. Adicionalmente, a composição de anticorpo que se liga a dois ou mais epítopos não superpostos de EGFR pode fornecer uma eficácia superior comparada com a composição que atinge apenas um epítopo. Em particular, a composição de anticorpo pode fornecer eficácia superior com relação à diferenciação terminal de células de câncer *in vivo*. Para uma terapia com anticorpo monoclonal anti-EGFR, uma certa proporção de pacientes não responderá efetivamente ao tratamento com anticorpo. Para alguns pacientes, isso pode ser devido à rápida depuração do anticorpo ou por que o anticorpo gera uma resposta imune no paciente contra o anticorpo. Para alguns pacientes, a falha na resposta pode ser por que o seu câncer dependente de EGFR em particular expressa EGFR em uma conformação onde o anticorpo monoclonal não se liga ao seu epítopo. Isso pode ser devido a diferenças na glicosilação, devido à deleção de domínio ou devido a mutações e/ou SNP(s).

[000129] Para alguns cânceres, a estimulação autócrina de EGFR induzida pela produção de ligante pelas células de câncer também é

de importância, enquanto em outros casos o EGFR expresso pelas células de câncer não necessita de estimulação do ligante. Para os últimos tipos de câncer, um anticorpo capaz de inibir a ligação do ligante pode não ser eficaz.

[000130] Uma composição de anticorpo na qual os anticorpos são capazes de se ligar a pelo menos dois epítopos distintos sobre EGFR será mais amplamente aplicável, desde que a possibilidade de que ambos os epítopos sejam alterados, comparados com os epítopos reconhecidos pelo anticorpo, seja diminuída. Adicionalmente, a probabilidade de que todos os anticorpos sejam depurados pelo paciente é muito menor. A superioridade foi mostrada mais claramente em termos de indução de diferenciação terminal das células de câncer usando dois anticorpos para o Domínio III com epítopos não superpostos. Tal diferenciação terminal eficiente induzida por anticorpo de células de câncer não foi descrita antes e representa uma etapa significativa em direção ao planejamento eficiente de terapias de câncer baseadas em anticorpo. Os últimos resultados mostraram que resultados similares ou até superiores podem ser obtidos com uma combinação particular de dois anticorpos.

[000131] Para aperfeiçoar a eficácia clínica e ampliar a utilidade contra uma faixa maior de tipos de câncer dependentes de EGFR, o número de anticorpos na composição pode ser aumentado. Portanto, a composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a três epítopos não superpostos. A composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a quatro epítopos não superpostos. A composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a cinco epítopos não superpostos. A composição pode compreender anticorpos capazes de se ligar a seis epítopos não superpostos. Os exemplos do presente pedido mostram que pelo menos seis anticorpos distintos podem se ligar a EGFR de uma só vez (Exemplo

3). Isso não exclui que é possível ou até vantajoso planejar uma composição que compreenda anticorpos capazes de se ligar a mais do que seis, tal como sete ou oito epítópos não superpostos, pela seleção cuidadosa dos anticorpos.

[000132] Existem vantagens na inclusão de anticorpos com epítópos superpostos já que isso aumenta a probabilidade de que o epítopo seja ligado. A lógica por trás disso é que o epítopo em alguns pacientes e/ou em algumas células de câncer pode ser mudado devido a alterações conformacionais ou mutações ou SNPs. Apesar de isso poder afetar a ligação de um anticorpo, pode não afetar a ligação de outro anticorpo que se ligue a um epítopo superposto. Adicionalmente, existe o risco de que um dos anticorpos possa ser depurado pelo paciente, por que ele é visto como um antígeno. Pela inclusão de dois anticorpos que se ligam a epítópos diferentes, mas superpostos, a consequência da depuração de um dos dois anticorpos e a consequência de uma mutação em um epítopo é diminuída.

[000133] Resultados superiores foram obtidos com combinações específicas de anticorpos capazes de se ligar a dois epítópos de EGFR não superpostos. Essas composições preferidas com “dois anticorpos” são descritas em mais detalhes abaixo junto com a orientação sobre como planejar as composições de anticorpo da invenção. Verificou-se que, comparada com a composição de três anticorpos que compreende os anticorpos 992, 1030 e 1042, uma eficácia similar e até melhorada poderia ser obtida quando se usa uma composição com apenas dois anticorpos: 992 e 1024. Como os anticorpos 1024 e 1042 pertencem ao mesmo cluster e, portanto, possuem a mesma especificidade de ligação, na realidade, os resultados observados para a composição com três anticorpos, incluindo o efeito sobre a diferenciação terminal, podem ser atribuídos a apenas duas das especificidades de ligação (992 e 1024/1042) na

composição.

[000134] Os anticorpos da composição podem ser anticorpos quiméricos com cadeias variáveis não humanas e cadeias constantes humanas. As cadeias variáveis não humanas podem ser de camundongo, rato, ovelha, porco, galinha, primata não humano ou outro animal adequado. A fim de obter anticorpos totalmente humanos, os anticorpos podem ser gerados em um animal transgênico com genes de anticorpo humano. Os anticorpos também podem ser chamados de anticorpos humanizados, nos quais as sequências de CDR não humanas foram enxertadas em sequências estruturais humanas.

[000135] Preferivelmente, a cadeia constante humana é do isotipo IgG1 ou IgG2. Mais preferivelmente, todos os anticorpos na composição têm o mesmo isotipo para facilitar a produção. Entretanto, pode ser vantajoso incluir na mesma composição anticorpos com isotipo diferente.

[000136] Preferivelmente, as composições de anticorpo da invenção compreendem anticorpos capazes de se ligar a EGFR, selecionado do grupo que consiste em EGFR humano, EGFR humano mutado e variantes por deleção de EGFR humano. Preferivelmente, os anticorpos são capazes de se ligar a ambos os EGFR humano e de primata não humano, tal que eles possam ser testados em estudos toxicológicos relevantes antes dos experimentos clínicos. Preferivelmente, o primata não humano é o macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

[000137] A fim de apoiar o conceito identificado acima de tratar câncer dependente de EGFR usando anticorpos que se ligam a dois ou mais epítopos distintos, os presentes inventores identificaram, fabricaram e caracterizaram uma série de anticorpos quiméricos de camundongo/humano direcionados contra EGFR. Esses anticorpos

quiméricos têm sido comparados individualmente e em misturas com os anticorpos monoclonais atuais, exemplificados por Erbitux® e Vectibix®.

[000138] A Tabela 1 mostra um resumo dos anticorpos quiméricos individuais e as características associadas a eles. Anticorpo no é um número de *referência* usado ao longo do presente pedido. A especificidade é o domínio de EGFR ao qual o anticorpo se liga, como evidenciado no Exemplo 3. DeltaEGFR é a habilidade do anticorpo de se ligar ao EGFR mutante (EGFRvIII) como descrito no exemplo 1. EGFR de cynomolgus é a habilidade do anticorpo de se ligar ao EGFR de cynomolgus (exemplo 10). EGF inib. é a habilidade do anticorpo de inibir a ligação a EGF (exemplo 4). Proliferação é a habilidade do anticorpo de inibir a proliferação de linhagens celulares de câncer, A431 e HN-5 (exemplo 6).

**Tabela 1. Anticorpos da invenção**

Anticorpo no.	Especificidade	deltaEGFR	EGFR de Cynomolgous	EGF inib.	Proliferação
992	Domínio III	não/fraca	sim	sim/fraca	Sim
1030	Domínio III	sim	sim	sim	sim
1024	Domínio III	sim	sim		sim
1042	Domínio III	fraca	sim	(sim)	sim
1277	Domínio III	sim	Sim	sim	HN5
1254	Domínio III	sim	Sim	sim	HN5
1208	Domínio III	sim	sim	sim	sim HN5+/-992
1320	Domínio III	fraca	não	sim	sim
1257	Domínio I/II	não	sim	não	sim
1261	Domínio I	não	Sim	não	sim
1229	Não Domínio I/II	sim	não	não	sim (A431)
1284	Domínio I	não	Sim	sim	sim
1344	Domínio I/II	não	sim	nd	HN5 w/992
1260	Domínio I/II	não	Sim	sim	A431
1308	Domínio I	não	sim	nd	HN5 w/992
1347	Domínio I	não	sim	nd	HN5 w/992
1428	Domínio I & II	não	Sim	sim	HN5 w/992

[000139] A partir dos dados gerados com os anticorpos quiméricos testados, sozinhos ou em combinação, em ensaios de proliferação, ligação, degradação/inativação de receptor e motilidade e em modelos animais, várias conclusões podem ser extraídas.

[000140] Os resultados obtidos com duas linhagens de célula de câncer, HN-5 e A431 (Exemplo 6) foram repetidos com linhagens de célula de câncer diferentes (MDA-MB, uma linhagem de célula de câncer de mama; DU145, uma linhagem de célula de câncer de próstata). O que é evidente nesses experimentos é que combinações de anticorpos fornecidas pelos presentes inventores apresentam eficácia contra uma faixa muito ampla de linhagens de célula de câncer, apoiando a eficácia das composições de anticorpo contra uma gama de conformações de EGFR.

[000141] Também foi mostrado que a superioridade de misturas de anticorpo é maior nos ensaios de proliferação onde concentrações fisiológicas de ligante (EGF) são adicionadas ao meio de crescimento do que quando EGF não é adicionada (*figura 17*). De acordo com a literatura (Hayashi e Sakamoto 1998 J Pharmacobiodyn 11:146-51), o soro contém aproximadamente 1 a 1,8 ng/mL ou 0,2 a 0,3 nM de EGF, enquanto que o suco gástrico é relatado conter 0,3 ng/mL (ca. 0,05 mM) (Pessonem *et al.* 1987 Life Sci. 40:2489-94). Em um ambiente *in vivo*, EGF e outros ligantes de EGFR estão provavelmente presentes e a habilidade da mistura de anticorpo em ser efetiva na presença de ligantes de EGFR é, portanto, um aspecto importante das misturas de anticorpo da presente invenção.

[000142] Os anticorpos quiméricos de camundongo/humano da presente invenção fornecem melhores resultados quando usados em combinação do que quando usados isoladamente. Isso é exemplificado em vários experimentos (veja, por exemplo, o Exemplo 6), nos quais os anticorpos quando testados isolados mostram apenas

efeitos antiproliferativos moderados sobre uma linhagem de célula de câncer (A431-NS), mas quando usados em qualquer combinação, mostram efeitos acentuadamente superiores. Esses resultados foram confirmados com as numerosas combinações dos anticorpos químéricos da presente invenção. Resultados particularmente superiores foram obtidos com uma composição que compreende os anticorpos 992 e 1024.

[000143] Por exemplo, vários anticorpos foram testados em um ensaio antiproliferação com A431-NS e HN-5 junto com qualquer um dos anticorpos 992, 1208, 1254 e 1277.

[000144] Estudos de ligação ao receptor mostraram que alguns anticorpos podem realmente estimular a ligação de anticorpos adicionais, tal que um anticorpo particular se liga em maiores quantidades ao receptor depois da saturação do receptor com um ou vários anticorpos. A ligação do anticorpo 992, direcionado contra o domínio III, se beneficia claramente desse efeito sinérgico obtido pela saturação prévia do receptor, com um ou mais anticorpos que se ligam a receptores não superpostos. Outro exemplo desse efeito cooperativo é visto quando o anticorpo 1396, dirigido contra um epítopo desconhecido, é testado contra EGFR saturado com anticorpos que se ligam a receptores não superpostos.

[000145] Estudos de ligação ao receptor também mostraram que é possível ligar pelo menos 6 anticorpos ao domínio extracelular de EGFR, simultaneamente. Esses 6 anticorpos representam 3 anticorpos para o Domínio III, um anticorpo para o Domínio I, um anticorpo para o Domínio I/II e um anticorpo que se liga a um epítopo desconhecido. De modo interessante, a ligação dos três anticorpos para o Domínio III parece facilitar a ligação subsequente de anticorpos adicionais. Isso sustenta claramente o conceito do fornecimento de composições de anticorpo com vários anticorpos que se ligam a epítópos distintos.

[000146] Quando se planeja a composição de uma composição de anticorpo contra EGFR, os anticorpos com epítópos não superpostos são preferivelmente usados já que esses fornecem um efeito sinérgico maior.

[000147] O domínio III de EGFR é de importância para a ligação do ligante ao receptor. Adicionalmente, a ligação do anticorpo ao Domínio III pode estabilizar EGFR na conformação monomérica ligada, que não leva à sinalização para o receptor. Por essas razões, é preferível que a composição de anticorpo contenha pelo menos dois anticorpos com especificidade para o Domínio III. Anticorpos preferidos para o Domínio III incluem os anticorpos 992, 1024, 1030, 1208, 1254, 1277 e 1320. A composição de anticorpo pode compreender preferivelmente, mais do que dois anticorpos para o Domínio III, tal como pelo menos 3 anticorpos para o Domínio III, por exemplo, pelo menos 4 anticorpos para o Domínio III, tal como pelo menos 5 anticorpos para o Domínio III, por exemplo, pelo menos 6 anticorpos para o Domínio III.

[000148] Em outra modalidade preferida, a composição de anticorpos compreende pelo menos um anticorpo para o Domínio I. Preferivelmente, pelo menos um anticorpo para o Domínio I é selecionado do grupo que consiste em anticorpos 1284, 1308, 1344 e 1347. Mais preferivelmente, pelo menos um anticorpo para o Domínio I é selecionado do grupo que consiste em anticorpos 1284 e 1347.

[000149] Em outra modalidade preferida, a composição de anticorpo compreende pelo menos um anticorpo para o Domínio I/II. Preferivelmente, pelo menos um anticorpo para o Domínio I/II é selecionado do grupo que consiste em anticorpos 1257, 1260, 1261, 1428 e 1434. Mais preferivelmente, o pelo menos um anticorpo para o Domínio I/II é selecionado do grupo que consiste em anticorpos 1261 e 1260.

[000150] Misturas preferidas com três anticorpos incluem: Anticorpos

992+1320+1024; 992+1024+1030; 992+1255+1024; 992+1024+1214;  
992+1024+1284; 992+1024+1211; 992+1024+1030.

[000151] Misturas preferidas com quatro anticorpos incluem:  
Anticorpos 992+1320+1024+1030; 992+1024+1030+1284.

[000152] Misturas preferidas com cinco anticorpos incluem:  
Anticorpos 992+1030+1024+1260+1347;  
992+1030+1024+1261+1347; 992+1030+1024+1261+1284.

[000153] Misturas preferidas com oito anticorpos incluem: Anticorpos  
992+1030+1024+1277+1254+1320+1260+1261+1284+1347.

[000154] Adicionalmente, a fim de ser capaz de realizar um estudo toxicológico em um primata não humano, é preferível que todos os anticorpos na composição se liguem ao EGFR de humano, assim como o pelo menos um EGFR de primata adicional, tal como EGFR de chimpanzé, Macaca mulatta, macaco Rhesus e outros macacos ou macaco cynomolgus. O macaco cynomolgus é um animal relativamente pequeno e muito bem adequado para estudos toxicológicos. Portanto, o EGFR de primata adicional é preferivelmente EGFR de cynomolgus. Preferivelmente, os anticorpos se ligarão com aproximadamente a mesma afinidade ao EGFR de humano e de primata não humano.

[000155] A presente invenção mostrou resultados superiores em um ou mais ensaios funcionais quando se combina 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 anticorpos em uma composição. Embora esses dados forneçam uma orientação na seleção do número de anticorpos na composição, eles não devem ser interpretados de forma alguma como limitantes. A composição pode compreender mais do que 8 anticorpos apesar dos dados experimentais mostrarem apenas a ligação simultânea de 6 anticorpos. Pode haver outras razões para a inclusão de mais do que 6 anticorpos na composição, tal como, por exemplo, diferenças na taxa de depuração dos anticorpos membros.

[000156] Uma característica adicional preferida dos anticorpos das composições é a homogeneidade de proteína, tal que os anticorpos possam ser facilmente purificados. Para os anticorpos membros individuais, um perfil de cromatografia de troca de íon com um pico distinto é preferido por facilitar a caracterização. Um perfil de cromatografia de troca de íon nítido também é preferido por facilitar a caracterização da composição final de anticorpo. Também é preferível quando se combina anticorpos que eles possam ser distinguidos usando a cromatografia por troca de íon, tal que a composição com todos os anticorpos possa ser caracterizada em uma corrida.

[000157] Os anticorpos podem ser de qualquer origem, tal como humana, de murino, coelho, galinha, porco, lhama, ovelha. Os anticorpos também podem ser quiméricos como descrito nos exemplos ou podem ser humanizados, super-humanizados ou versões reestruturadas dessas, usando métodos bem conhecidos descritos na técnica.

#### *Uma composição de anticorpo preferida*

[000158] Como mostrado nos exemplos em anexo, a composição anti-EGFR baseada nos anticorpos 992 e 1024 tem propriedades únicas e distintas. A ligação do anticorpo 992 é intensificada pela ligação de outros anticorpos, incluindo 1024. Em contraste com anticorpos comerciais, ambos, 992 e 1024, se ligam preferencialmente a epítopos conformacionais apresentados sobre as células (Exemplos 14 e 15). Ambos os epítopos de 992 e 1024 se superpõem, mas são distintos, dos epítopos de Erbitux e Vectibix . Em contraste com várias outras composições de dois anticorpos, nas quais os anticorpos individuais se ligam a epítopos não superpostos, a composição baseada nas especificidades de ligação dos anticorpos 992 e 1024 desencadeia a internalização do receptor rapidamente e eficazmente . Um novo mecanismo de ação envolvendo diferenciação terminal

acompanhada com expressão de involucrina aumentada e a aparência de pérolas de queratina é observada em um modelo animal depois do tratamento com composições de anticorpo baseadas nos anticorpos 992 e 1024. Esse mecanismo de ação único leva a inibição do crescimento mais eficaz e mantida *in vitro* e *in vivo*. Isso é visto mais claramente nos exemplos *in vivo*, onde os tumores continuam a diminuir depois do término do tratamento. No grupo de controle que recebe Erbitux, os tumores começam a crescer logo depois do término do tratamento. Isso indica claramente um mecanismo de ação diferente.

[000159] Acredita-se que o novo mecanismo de ação é obtido pelo uso da combinação de duas especificidades de ligação exibidas pelos anticorpos 992 e 1024 em uma composição de anticorpo. Esse mecanismo de ação também é visto quando um terceiro anticorpo que não compete com os anticorpos 992 e 1024 é usado, por exemplo, na combinação tripla de anticorpos 992, 1024 e 1030.

[000160] Essas observações levaram ao modelo de uma composição de anticorpo que compreende pelo menos 2 moléculas distintas de anticorpo anti-EGFR humano, em que a primeira molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 109 de SEQ ID NO:72) e VH (aminoácidos 3 a 124 de SEQ ID NO:40) do anticorpo 992, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992 (SEQ ID NO: 116 e 111), um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo como o anticorpo 992 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 992 a EGFR humano; e em que uma segunda molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 114 de SEQ ID NO:73) e VH (aminoácidos 3 a 120 de SEQ ID NO:41) do anticorpo 1024, um

anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024 (SEQ ID NO: 120 e 114), um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo como o anticorpo 1024 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1024 ao EGFR humano.

[000161] Preferivelmente, a dita primeira molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 992, um anticorpo que compreende as sequências de VL e VH do anticorpo 992, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992 e um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo 992; e a dita segunda molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1024, um anticorpo que compreende as sequências de VL e VH do anticorpo 1024, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024 e um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo 1024.

[000162] A presente invenção contempla mutações nas sequências de CDR3 dos anticorpos 992 e 1024 para fornecer anticorpos com a mesma especificidade de ligação. Portanto, em uma modalidade, um anticorpo que possui a mesma especificidade de ligação que o anticorpo 992 compreende uma CDRH3 que possui a seguinte fórmula: CTX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub> X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>W na qual X<sub>1</sub> a X<sub>15</sub> são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados abaixo:

X<sub>1</sub> = R ou K;

X<sub>2</sub> = N, D, E ou Q;

X<sub>3</sub> = G, A, V ou S;

X<sub>4</sub> = D, E, N ou Q;

X<sub>5</sub> = Y, F, W ou H;

X<sub>6</sub> = Y, F, W ou H;

X<sub>7</sub> = V, I, L ou A;

X<sub>8</sub> = S, T, G ou A;

$X_9 = S, T, G$  ou  $A;$

$X_{10} = G, A, V,$  ou  $S;$

$X_{11} = D, E, N$  ou  $Q;$

$X_{12} = A, G, V,$  ou  $S;$

$X_{13} = M, L, I$  ou  $V$

$X_{14} = D$  ou  $E;$  e

$X_{15} = Y$  ou  $F;$

e uma CDR3 descrita pela seguinte fórmula:  $CX_1X_2X_3X_4X_5$

$X_6PPTF$  na qual  $X_1$  a  $X_6$  são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados abaixo:

$X_1 = Q$  ou  $H;$

$X_2 = H, E$  ou  $Q;$

$X_3 = Y, F, W$  ou  $H;$

$X_4 = N, Q$  ou  $H;$

$X_5 = T, S, G$  ou  $A;$  e

$X_6 = V, I, L$  ou  $A$

[000163] Em uma modalidade, um anticorpo que possui a mesma especificidade de ligação que o anticorpo 1024 comprehende uma CDRH3 que possui a seguinte fórmula:  $CVX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}W$  onde  $X_1$  a  $X_{11}$  são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados abaixo:

$X_1 = R$  ou  $K;$

$X_2 = Y, F, W$  ou  $H;$

$X_3 = Y, F, W$  ou  $H;$

$X_4 = G, A, V,$  ou  $S;$

$X_5 = Y, F, W$  ou  $H;$

$X_6 = D, E, N$  ou  $Q;$

$X_7 = E$  ou  $D;$

$X_8 = A, G, V,$  ou  $S;$

$X_9 = M, L, I$  ou  $V;$

$X_{10} = D, E, N$  ou  $Q$ ; e  
 $X_{11} = Y$ , ou  $F$ ;  
e uma CDR3 descrita pela seguinte fórmula:  
 $CX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7TF$  onde  $X_1$  a  $X_7$  são selecionados individualmente dos grupos de aminoácidos listados abaixo:

$X_1 = A, G$ , ou  $V$ ;  
 $X_2 = Q$  ou  $H$ ;  
 $X_3 = N, Q$  ou  $H$ ;  
 $X_4 = L, I, M$  ou  $V$ ;  
 $X_5 = E, D, N$  ou  $Q$ ;  
 $X_6 = L, I, M$  ou  $V$ ; e  
 $X_7 = Y, F, W$  ou  $H$ .

[000164] Anticorpos com CDR3s mutadas podem ser feitos usando técnicas padronizadas e ser expressos e testados quanto a ligação usando os métodos aqui descritos.

[000165] Os anticorpos, de acordo com esse aspecto da invenção, podem ser quiméricos, humanos, humanizados, reestruturados ou super-humanizados. Isso pode ser feito usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os anticorpos 992 e 1024 podem ser humanizados usando os métodos descritos no Exemplo 18. Métodos para a "super-humanização" estão descritos em US 6.881.557.

[000166] Mais preferivelmente, a dita primeira molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 992, um anticorpo que comprehende as sequências de VL e VH do anticorpo 992 e um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 992; e a dita segunda molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1024, um anticorpo que comprehende as sequências de VL e VH do anticorpo 1024 e um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1024.

[000167] Mais preferivelmente, a dita primeira molécula distinta de

anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 992 e um anticorpo que compreende as sequências de VL e VH do anticorpo 992; e a dita segunda molécula distinta de anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1024 e um anticorpo que compreende as sequências de VL e VH do anticorpo 1024.

[000168] Mais preferivelmente, a composição compreende os anticorpos 992 e 1024.

[000169] Como descrito, o primeiro e segundo anticorpos anti-EGFR preferivelmente não inibem a ligação ao EGFR humano um do outro. Até mais preferivelmente, pelo menos um dos anticorpos é capaz de aumentar a capacidade máxima de ligação do outro anticorpo com relação ao EGFR humano. Esse efeito é observado com os anticorpos 992 e 1024 (Exemplo 16).

[000170] A proporção entre os dois anticorpos não precisa ser exatamente uma proporção 1:1. Consequentemente, a proporção do primeiro anticorpo em relação ao segundo anticorpo na composição pode estar entre 5 e 95%, tal como entre 10 e 90%, preferivelmente entre 20 e 80%, mais preferivelmente entre 30 e 70%, mais preferivelmente entre 40 e 60%, tal como entre 45 e 55%, tal como de aproximadamente 50%.

[000171] Preferivelmente, o primeiro e segundo anticorpos são isotipos de IgG1 ou IgG2.

[000172] Exemplos de anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que o anticorpo 992 identificado pelos presentes inventores são anticorpos do cluster de anticorpo que compreende os clones 1209, 1204, 992, 996, 1033 e 1220.

[000173] Exemplos de anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que o anticorpo 1024 identificado pelos presentes inventores são anticorpos do cluster de anticorpo que compreende os clones 1031,

1036, 1042, 984, 1024, 1210, 1217, 1221 e 1218.

[000174] A CDR3 determina a especificidade de ligação dos anticorpos. Em modalidades preferidas, o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 992 compreende, adicionalmente, a CDR1 e CDR2 de VH e VL do anticorpo 992. Igualmente, o anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 1024 compreende, adicionalmente e preferivelmente, a CDR1 e CDR2 de VH e VL do anticorpo 1024. As sequências das CDR dos anticorpos podem ser encontradas na Tabela 12, Exemplo 17.

[000175] Em outras modalidades, o anticorpo que compete com o anticorpo 992 é selecionado do grupo que consiste em anticorpos 1208, 1254 e 1277. Igualmente, o anticorpo que compete com o anticorpo 1024 pode ser selecionado do grupo que consiste em anticorpos 1042 e 1320.

[000176] Em uma modalidade, a composição não contém anticorpos adicionais em adição aos ditos primeiro e segundo anticorpos, mais preferivelmente não contém anticorpos anti-EGFR adicionais.

[000177] Em outras modalidades, a composição compreende ainda um terceiro anticorpo anti-EGFR distinto, em que a dita molécula distinta do terceiro anticorpo anti-EGFR é selecionada do grupo que consiste em anticorpo 1030, um anticorpo que compreende as sequências de VL (aminoácidos 3 a 113 de SEQ ID NO:74) e VH (aminoácidos 3 a 120 de SEQ ID NO:42) do anticorpo 1030, um anticorpo que possui as CDR3s do anticorpo 1030 (SEQ ID NO: 112 e 119), um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo como o anticorpo 1030 e um anticorpo capaz de inibir a ligação do anticorpo 1030 a EGFR humano. O dito terceiro anticorpo preferivelmente resulta em uma ligação intensificada a EGFR humano do dito primeiro e/ou segundo anticorpo. Em uma modalidade, a composição não contém anticorpos adicionais em adição aos ditos primeiro, segundo e terceiro

anticorpos, mais preferivelmente não contém anticorpos anti-EGFR adicionais.

[000178] O anticorpo que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo 1030 pode ser selecionado do cluster de anticorpo que consiste em clones 1195, 1030, 1034, 1194, 980, 981, 1246 e 1223.

[000179] O anticorpo que compreende a CDR3 do anticorpo 1030 pode compreender, adicionalmente, a CDR1 e a CDR2 de VH e VL do anticorpo 1030.

[000180] Os anticorpos podem ser formulados em um recipiente para administração. Entretanto, eles podem ser fabricados, purificados e caracterizados individualmente e ser fornecidos em dois ou três recipientes separados como um kit em partes, com um anticorpo em cada recipiente. Como tal, eles podem ser administrados simultaneamente, sucessivamente ou separadamente.

[000181] Em um aspecto adicional, as duas especificidades de ligação dos anticorpos 992 e 1024 são combinadas em uma molécula de ligação biespecífica. Preferivelmente, a molécula de ligação biespecífica compreende as CDRs dos anticorpos 992 e 1024, mais preferivelmente as sequências de VH e VL dos anticorpos 992 e 1024. A molécula de ligação biespecífica pode ser um anticorpo de domínio variável duplo como descrito no exemplo 19. Uma molécula de ligação biespecífica também pode ser designada na forma de um fragmento Fab biespecífico, um scFv biespecífico ou um diacorpo como descrito na literatura.

[000182] As composições de anticorpo baseadas nas especificidades de ligação dos anticorpos 992 e 1024 levam, preferivelmente a uma ou mais internalizações do receptor, a regressão de tumores de A431-NS *in vivo*, a indução de diferenciação terminal de células A431-NS *in vivo* e a regulação positiva da expressão involucrina do tumor *in vivo*.

[000183] O presente pedido fornece vários exemplos de anticorpos

que possuem os mesmos efeitos ou efeitos similares como a combinação dos anticorpos 992 e 1024. Exemplos desses incluem os anticorpos obtidos a partir da mesma imunização e que pertencem aos mesmos clusters e anticorpos que competem individualmente com um dos dois anticorpos. As composições de anticorpo com efeito igual ou similar podem ser designadas com base nas sequências de VH e VL dos anticorpos 992 e 1024 e também com base nas CDRs desses anticorpos, em particular as CDR3s dos dois anticorpos.

[000184] Composições de anticorpo adicionais com efeitos iguais ou similares podem ser feitas pela realização de imunização e rastreamento essencialmente como descrito nos exemplos. Anticorpos com a mesma especificidade como o anticorpo 992 e 1024 podem ser identificados em dois ensaios de competição separados como aqui descritos. Finalmente, composições de anticorpo onde um anticorpo intensifica a ligação de outro anticorpo podem se identificadas pela realização de experimentos de ligação essencialmente como descrito no Exemplo 16; As composições de anticorpo podem ser rastreadas como descrito nos exemplos para os efeitos de internalização do receptor, eficácia *in vitro* e *in vivo*, afinidade de ligação, etc.

#### Usos das composições de anticorpo da invenção

[000185] Para uso no tratamento e na prevenção *in vivo* de doenças relacionadas à expressão de EGFR (por exemplo, superexpressão), os anticorpos da invenção são administrados a pacientes (por exemplo, indivíduos humanos) em dosagens eficazes terapeuticamente (por exemplo, dosagens que resultam na inibição do crescimento, fagocitose, redução da motilidade, diferenciação terminal e/ou destruição de células de tumor que expressam EGFR) usando qualquer via de administração adequada, tal como injeção e outras vias de administração conhecidas na técnica para produtos clínicos baseados em anticorpo.

[000186] Doenças relacionadas à EGFR típicas que podem ser tratadas, melhoradas e/ou prevenidas usando os anticorpos da invenção incluem, mas não são limitadas a doenças autoimunes e cânceres. Por exemplo, os cânceres que podem ser tratados, melhorados e/ou prevenidos incluem câncer de bexiga, mama, uterino/cervical, colón, rim, ovário, próstata, célula renal, pâncreas, colón, reto, estômago, célula escamosa, pulmão (célula não pequena), esôfago, cabeça e pescoço, pele. Doenças autoimunes que podem ser tratadas incluem, por exemplo, psoríase.

[000187] Em outra modalidade, a invenção refere-se a um método para o tratamento, melhora e/ou prevenção de glioblastoma, incluindo o glioblastoma multiforme; astrocitoma, incluindo o astrocitoma da infância; glioma; neuroblastoma; tumores neuroendócrinos do trato gastrintestinal; carcinoma broncoalveolar; sarcoma de célula dendrítica folicular; sarcoma de glândulas salivares; ameloblastoma; tumor maligno de nervo periférico; tumores endócrinos pancreáticos; ou tumores de célula germinativa testicular, incluindo seminoma, carcinoma embrionário, tumor do saco vitelino, teratoma e coriocarcinoma.

*Isolamento e seleção de pares codificadores de cadeia pesada variável e de cadeia leve variável*

[000188] O processo de geração de uma composição de anticorpo recombinante anti-EGFR envolve o isolamento de sequências que codificam cadeias pesadas variáveis ( $V_H$ ) e cadeias leves variáveis ( $V_L$ ) a partir de uma fonte adequada, gerando dessa maneira um repertório de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$ . Geralmente, a fonte adequada para obtenção de sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  são frações celulares que contêm linfócitos tais como amostras de sangue, baço ou medula óssea de um animal não humano imunizado/vacinado com um polipeptídeo ou peptídeo de EGFR humano ou com proteínas

EGFR derivadas de uma célula que expressa EGFR humano ou com células que expressam EGFR humano ou frações de tais células. Preferivelmente, as frações que contêm linfócitos são coletadas de mamíferos não humanos ou de animais transgênicos com genes de imunoglobulina humana. A fração celular que contém linfócito pode ser enriquecida adicionalmente para obter uma população de linfócitos em particular, por exemplo, células da linhagem de linfócito B. Preferivelmente, o enriquecimento é realizado usando a classificação de célula com esfera magnética (MACS) e/ou a classificação celular ativada por fluorescência (FACS), tirando vantagem de proteínas marcadoras da superfície celular específicas para a linhagem, por exemplo, para células B, blastos plasmáticos e/ou células plasmáticas. Até mais preferivelmente, as células com alta expressão de CD43 e CD138 são isoladas do baço ou do sangue. Essas células são, às vezes, denominadas de células plasmáticas circulantes, células plasmáticas precoces ou blastos plasmáticos. Para facilitar, elas são denominadas células plasmáticas na presente invenção, embora as outras expressões possam ser usadas alternativamente.

[000189] O isolamento das sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  pode ser realizado da maneira clássica, onde as sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  são combinadas aleatoriamente em um vetor para gerar uma biblioteca combinatória de pares de sequências. Entretanto, na presente invenção é preferido refletir a diversidade, afinidade e especificidade dos anticorpos produzidos em uma resposta imune humoral depois da imunização de EGFR. Isso envolve a manutenção do pareamento de  $V_H$  e  $V_L$  originalmente presente no doador, gerando dessa maneira um repertório de pares de sequências onde cada par codifica uma cadeia variável pesada ( $V_H$ ) e uma cadeia variável leve ( $V_L$ ), que correspondem a um par de  $V_H$  e  $V_L$  originalmente presente em um anticorpo produzido pelo doador, a

partir do qual as sequências são isoladas. Isso também é denominado como um par cognato de sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  e o anticorpo é denominado como anticorpo cognato. Preferivelmente, os pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  da presente invenção, combinatórios ou cognatos, são obtidos de camundongos doadores e, portanto, as sequências são de murino.

[000190] Existem várias abordagens diferentes para a geração de pares cognatos de sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$ , uma abordagem envolve a amplificação e o isolamento das sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  de células isoladas classificadas a partir de uma fração celular que contém linfócito. A fim de obter um repertório de pares de sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  que representem a diversidade dos pares de sequência de  $V_H$  e  $V_L$ , um método de alta eficiência com o mínimo de embaralhamento possível (combinação aleatória) dos pares de  $V_H$  e  $V_L$  é preferido, por exemplo, como descrito no WO 2005/042774 (incorporado aqui por *referência*).

[000191] As sequências que codificam  $V_H$  e  $V_L$  podem ser amplificadas separadamente e pareadas em uma segunda etapa ou elas podem ser pareadas durante a amplificação (Coronella *et al.* 2000. Nucleic Acids Res. 28: E85; Babcock *et al* 1996. PNAS 93: 7843-7848 e WO 2005/042774). Uma segunda abordagem envolve a amplificação na célula e o pareamento das sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  (Embleton *et al.* 1992. Nucleic Acids Res. 20: 3831-3837; Chapal *et al.* 1997. BioTechniques 23: 518-524). # P 41Uma terceira abordagem é o método de seleção de anticorpo de linfócito (SLAM) que combina um ensaio hemolítico em placa com a clonagem de cDNA de  $V_H$  e  $V_L$  (Babcock *et al.* 1996. PNAS 93:7843-7848). Outro método que pode ser usado com camundongos é a técnica padronizada do hibridoma, seguida pelo rastreamento e seleção de candidatas em potencial e subsequente clonagem dos anticorpos

codificados.

[000192] Em uma modalidade preferida da presente invenção, um repertório de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$ , onde os pares de membros refletem os pares de genes responsáveis pela resposta imune humoral que resulta da imunização com EGFR, é gerado de acordo com um método que compreende as etapas de i) fornecer uma fração celular que contenha linfócito de um animal doador imunizado com EGFR humano; ii) opcionalmente, enriquecer células B ou células plasmáticas da dita fração; iii) obter uma população de células únicas isoladas, que compreende distribuir as células da dita fração de célula individualmente em uma pluralidade de recipientes; iv) amplificar e efetuar a ligação dos pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  em um procedimento de RT-PCR multiplex com extensão superposta, usando um modelo derivado das ditas células únicas isoladas e v) opcionalmente, realizar uma nested PCR dos pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  ligados. Preferivelmente, os pares codificadores cognatos isolados de  $V_H$  e  $V_L$  são submetidos a um procedimento de rastreamento como descrito abaixo.

[000193] Uma vez que os pares de sequência de  $V_H$  e  $V_L$  tenham sido gerados, um procedimento de rastreamento para identificar sequências que codificam pares de  $V_H$  e  $V_L$  com reatividade de ligação frente a um antígeno associado a EGFR é realizado. Preferivelmente, o antígeno associado a EGFR está compreendido na parte extracelular de EGFR, tal como no domínio III, II, I e/ou IV, fragmentos dos domínios ou no domínio extracelular completo. Outros抗ígenos incluem mutantes, tais como mutantes por deleção de EGFR ou SNPs ou seus fragmentos. Se os pares de sequência de  $V_H$  e  $V_L$  são combinatórios, um procedimento de apresentação em fago pode ser aplicado para enriquecer os pares de  $V_H$  e  $V_L$  que codificam fragmentos de anticorpo que se ligam a EGFR antes do rastreamento.

[000194] A fim de refletir a diversidade, afinidade e especificidade dos anticorpos produzidos em uma resposta humoral depois da imunização com EGFR, a presente invenção desenvolveu um procedimento de rastreamento de pares cognatos, a fim de obter uma diversidade a mais ampla possível. Para os propósitos de rastreamento, o repertório de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  são expressos individualmente ou como fragmentos de anticorpo (por exemplo, scFv ou Fab) ou como anticorpos de extensão completa usando tanto um vetor de rastreamento bacteriano ou de mamífero transfetado para uma célula hospedeira adequada. O repertório de Fabs/anticorpos pode ser rastreado – sem limitação – quanto à reatividade a EGFR para a atividade anti-proliferativa contra uma linhagem de célula de câncer que expressa EGFR e quanto à habilidade para inibir o ligante (por exemplo, EGF) que se liga a EGFR, para a inibição da fosforilação, indução de apoptose, internalização de EGFR.

[000195] Em paralelo, um repertório de Fabs/anticorpos é rastreado contra抗ígenos selecionados, tais como peptídeos de EGFR humanos e opcionalmente de cynomolgus, ou chimpanzé ou macaco rhesus. Os peptídeos antigenicos podem, por exemplo, ser selecionados a partir do domínio extracelular de EGFR humano, domínio extracelular de EGFR mutante humano e extracelular de EGFR de cynomolgus ou seus fragmentos. Os peptídeos podem ser biotinilados para facilitar a imobilização sofre esferas ou placas durante o rastreamento. Meios de imobilização alternativos também podem ser usados. Os抗ígenos são selecionados com base no conhecimento da biologia de EGFR e o efeito neutralizante e/ou protetor esperado que os anticorpos capazes de se ligar a esses抗ígenos podem, potencialmente, fornecer. Esse procedimento de rastreamento pode ser igualmente aplicado a uma biblioteca de

apresentação em fago combinatória.

[000196] As proteínas EGFR recombinantes usadas para o rastreamento podem ser expressas em bactérias, células de inseto, células de mamífero ou outro sistema de expressão adequado. Para o processamento correto (incluindo a glicosilação), as proteínas são expressas em células de mamíferos. O ECD da proteína EGFR pode ser expresso tanto como uma proteína solúvel (sem a região transmembrana e intracelular) quanto ela pode ser fundida a uma terceira proteína para aumentar a estabilidade. Se a proteína EGFR é expressa com um marcador de fusão, o parceiro de fusão pode ser clivado antes do rastreamento. Em adição ao rastreamento primário descrito acima, um rastreamento secundário pode ser realizado, a fim de assegurar que nenhuma das sequências selecionadas codifica falsos positivos.

[000197] Geralmente, os ensaios imunológicos são adequados para o rastreamento realizado na presente invenção. Tais ensaios são bem conhecidos na técnica e constituem, por exemplo, ensaios ELISPOT, ELISA, FLISA, de membrana (por exemplo, Western blots), arranjos sobre filtros e FACS. Os ensaios podem ser realizados sem quaisquer etapas de enriquecimento prévio, utilizando polipeptídeos produzidos a partir das sequências que codificam os pares de  $V_H$  e  $V_L$ . No caso em que o repertório de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  são pares cognatos, nenhum enriquecimento, por exemplo, apresentação em fago, é necessário antes do rastreamento. Entretanto, no rastreamento de bibliotecas combinatórias, os imunoensaios são preferivelmente realizados em combinação ou acompanhando métodos de enriquecimento, tais como apresentação em fago, apresentação em ribossoma, apresentação em superfície bacteriana, apresentação em levedura, apresentação em vírus de eucarioto, apresentação em ENA ou apresentação covalente (revisado por FitzGerald, K., 2000. Drug

Discov. Today 5, 253-258).

[000198] As sequências que codificam os pares de  $V_H$  e  $V_L$  selecionadas no rastreamento são submetidas, geralmente, ao sequenciamento e analisadas com relação à diversidade das regiões variáveis. Em particular, a diversidade nas regiões de CDR é de interesse, mas também a representação da família de  $V_H$  e  $V_L$  é de interesse. Baseado nessas análises são selecionadas as sequências que codificam os pares de  $V_H$  e  $V_L$  que representam a diversidade global dos anticorpos que se ligam a EGFR isolados de um ou mais animais doadores. Preferivelmente, as sequências com diferenças em todas as regiões de CDR (CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL1, CDRL2 e CDRL3) são selecionadas. Se existirem sequências com uma ou mais regiões de CDR idênticas ou muito similares, que pertençam a famílias diferentes de  $V_H$  ou  $V_L$ , essas também são selecionadas. Preferivelmente, pelo menos a região CDR3 da cadeia variável pesada (CDRH3) difere entre os pares de sequência selecionados. Potencialmente, a seleção de pares de sequências de  $V_H$  e  $V_L$  pode ser baseada formalmente na variabilidade da região CDRH3. Durante a iniciação e amplificação das sequências, podem ocorrer mutações nas regiões estruturais da região variável, em particular na primeira região estrutural. Preferivelmente, os erros que ocorram na primeira região estrutural são corrigidos a fim de garantir que as sequências correspondam completamente ou pelo menos a 98% daquelas da origem germinativa, por exemplo, tal que as sequências de  $V_H$  e  $V_L$  sejam totalmente de murino.

[000199] Quando é assegurado que a diversidade global da coleção de sequências selecionadas que codificam os pares de  $V_H$  e  $V_L$  é altamente representativa da diversidade vista a nível genético em uma resposta humoral a uma imunização com EGFR, é esperado que a especificidade global dos anticorpos expressos a partir de uma

coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  também seja representativa com relação à especificidade dos anticorpos produzidos nos animais imunizados com EGFR. Uma indicação de que a especificidade dos anticorpos expressos a partir de uma coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  é representativa da especificidade dos anticorpos construídos pelos doadores, pode ser obtida pela comparação de títulos de anticorpo contra os抗ígenos selecionados do sangue do doador com a especificidade dos anticorpos expressos a partir de uma coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$ . Adicionalmente, a especificidade dos anticorpos expressos a partir de uma coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  selecionados pode ser analisada mais tarde. O grau de especificidade se correlaciona com o número de抗ígenos diferentes contra os quais a reatividade de ligação pode ser detectada. Em uma modalidade adicional da presente invenção, a especificidade dos anticorpos individuais expressos a partir de uma coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  é analisada pelo mapeamento de epítopo.

[000200] O mapeamento de epítopo pode ser realizado por várias metodologias, que não necessariamente excluem uma a outra. Uma maneira de mapear a especificidade do epítopo de uma molécula de anticorpo é avaliar a ligação a peptídeos de extensões variáveis derivados da estrutura primária do抗ígeno alvo. Tais peptídeos podem ser tanto lineares quanto conformacionais e podem ser usados em vários formatos de ensaio, incluindo ELISA, FLISA e ressonância de plasma de superfície (SPR, Biacore, FACS). Adicionalmente, os peptídeos podem ser racionalmente selecionados usando os dados de sequência e estrutura disponíveis para representar, por exemplo, regiões extracelulares ou regiões conservadas do抗ígeno alvo ou eles podem ser planejados como um painel de peptídeos superpostos que representam uma parte selecionada ou todo o抗ígeno (Meloen

RH, Puijk WC, Schaaper WMM. Epitope mapping by PEPSCAN. In: Immunology Methods Manual. Ed. Iwan Leftkovits 1997, Academic Press, pp 982-988). A reatividade específica de um clone de anticorpo com um ou mais de tais peptídeos geralmente será uma indicação da especificidade do epítopo. Entretanto, os peptídeos são, em muitos casos, imitadores deficientes dos epítópos reconhecidos pelo anticorpo surgido contra os抗ígenos proteináceos, devido à falta de conformação natural ou específica e devido à superfície geralmente maior da área enterrada de interação entre um anticorpo e um抗ígeno de proteína quando comparada a um anticorpo e um peptídeo. Um segundo método de mapeamento de epítopo, que permite a definição de especificidades diretamente sobre o抗ígeno da proteína, é pelo mascaramento seletivo de epítopo usando anticorpos existentes, bem definidos. A ligação reduzida de um segundo anticorpo de sondagem ao抗ígeno que acompanha o bloqueio é geralmente indicativa de epítópos compartilhados ou superpostos. O mapeamento de epítopo pelo mascaramento seletivo pode ser realizado por vários imunoensaios, incluindo, mas não restritos a ELISA e Biacore, que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, Ditzel *et al.* 1997. J. Mol. Biol. 267:684-695; Aldaz-Carroll *et al.* 2005. J. Virol. 79:6260-6271). Outro método em potencial para a determinação da especificidade do epítopo de anticorpos anti-EGFR é a seleção de mutantes de escape na presença de anticorpo. Isso pode, por exemplo, ser realizado usando um rastreio de alanina. O sequenciamento do(s) gene(s) de interesse te tais mutantes de escape geralmente revelará quais os aminoácidos no(s)抗ígeno(s) que são importantes para o reconhecimento pelo anticorpo e portanto constituem (parte do) o epítopo.

Produção de uma composição de anticorpo anti-EGFR a partir de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  selecionados

[000201] Uma composição da presente invenção pode ser produzida a partir de uma linhagem celular de expressão policlonal em um ou alguns biorreatores ou seus equivalentes. Seguindo essa abordagem, os anticorpos anti-EGFR podem ser purificados a partir do reator como uma preparação única sem ter que separar os membros individuais que constituem a composição de anticorpo anti-EGFR durante o processo. Se a composição de anticorpo é produzida em mais do que um biorreator, a composição de anticorpo anti-EGFR purificada pode ser obtida pelo agrupamento dos anticorpos obtidos dos sobrenadantes individualmente purificados de cada biorreator.

[000202] Uma maneira de produzir uma composição de anticorpo recombinante está descrita no WO 2004/061104 e no WO 2006/007859 (essas *referências* estão incorporadas aqui por *referência*). O método descrito neles é baseado na integração específica para o sítio da sequência codificadora do anticorpo no genoma das células hospedeiras individuais, assegurando que as cadeias de proteína de  $V_H$  e  $V_L$  são mantidas em seu pareamento original durante a produção. Adicionalmente, a integração específica para o sítio minimiza os efeitos de posição e, portanto, o crescimento e as propriedades de expressão das células individuais na linhagem celular policlonal são esperadas serem muito similares. Geralmente, o método envolve o seguinte: i) uma célula hospedeira com um ou mais sítios de reconhecimento de recombinase; ii) um vetor de expressão com pelo menos um sítio de reconhecimento de recombinase compatível com aquele da célula hospedeira; iii) geração de uma coleção de vetores de expressão pela transferência dos pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  do vetor de rastreamento para um vetor de expressão, tal que um anticorpo de extensão completa ou um fragmento de anticorpo possam ser expressos a partir do vetor (tal transferência pode não ser necessária se o vetor de rastreamento for

idêntico ao vetor de expressão); iv) transfecção da célula hospedeira com a coleção de vetores de expressão e um vetor que codifique uma recombinase capaz de combinar os sítios de reconhecimento da recombinase no genoma da célula hospedeira com aquele no vetor; v) obtenção/geração de uma linhagem celular policlonal a partir da célula hospedeira transfectada e vi) expressar e coletar a composição de anticorpo da linhagem celular policlonal.

[000203] Quando um pequeno número (2-3 ou mais) de anticorpos é usado para uma composição, esses podem ser expressos e purificados individualmente de uma maneira similar a fabricação de anticorpos monoclonais, por exemplo, como descrito no WO 2004/085474. Os anticorpos purificados podem ser misturados depois da purificação ou embalados em frascos separados para misturação antes da administração ou para administração em separado.

[000204] Preferivelmente, células de mamíferos tais como células CHO, células COS, células BHK, células de mieloma (por exemplo, células Sp2/0 ou NSO), fibroblastos tais como NIH 3T3 e células humanas imortalizadas, tais como células HeLa, células HEK 293 ou PER.C6, são usadas. Entretanto, células eucarióticas de não mamíferos ou procarióticas, tais como células de planta, células de inseto, células de levedura, células de fungos, *E.coli*, etc. também podem ser empregadas. Uma célula hospedeira adequada compreende um ou mais sítios de reconhecimento de recombinase adequados em seu genoma. A célula hospedeira também pode conter um modo de seleção que é operativamente ligado ao sítio de integração, a fim de ser capaz de selecionar os integrantes (isto é, células que possuem uma cópia integrada de um vetor de expressão de Ab anti-EGFR ou um fragmento de vetor de expressão no sítio de integração). A preparação de células que possuem um sítio FRT em uma localização predeterminada no genoma foi descrita em, por

exemplo, US 5.677.177. Preferivelmente, uma célula hospedeira tem apenas um único sítio de integração que está localizado em um sítio que permite a alta expressão do integrante (um assim chamado ponto quente).

[000205] Um vetor de expressão adequado compreende um sítio de reconhecimento de recombinação que corresponde ao(s) sítio(s) de reconhecimento de recombinase da célula hospedeira. Preferivelmente, o sítio de reconhecimento de recombinase está ligado a um gene de seleção adequado diferente do gene de seleção usado para a construção da célula hospedeira. Genes de seleção são bem conhecidos na técnica e incluem o gene da glutamina sintetase (GS), gene de di-hidrofolato redutase (DHFR) e neomicina, onde GS e DHFR podem ser usados para a amplificação do gene da sequência inserida de  $V_H$  e  $V_L$ . O vetor também pode conter dois sítios de reconhecimento de recombinase diferentes para permitir a troca de cassette mediada por recombinase (RMCE) da sequência codificadora do anticorpo ao invés da integração completa do vetor. RMCE está descrita em Langer *et al.* 2002; Schlake and Bode 1994. Sítios de reconhecimento de recombinase adequados são bem conhecidos na técnica e incluem os sítios FRT, lox e attP/attB. Preferivelmente, o vetor de integração é um vetor que codifica um isotipo, onde as regiões constantes (preferivelmente incluindo íntrons) estão presentes no vetor antes da transferência do par codificador de  $V_H$  e  $V_L$  do vetor de rastreamento (ou as regiões constantes já estão presentes no vetor de rastreamento se o rastreamento é realizado em anticorpos de extensão completa). As regiões constantes presentes no vetor podem ser tanto a região constante completa da cadeia pesada ( $CH_1$  a  $CH_3$  ou até  $CH_4$ ) quanto à região constante que codifica a parte Fc do anticorpo ( $CH_2$  a  $CH_3$  ou até  $CH_4$ ). A região constante da cadeia leve Kappa ou Lambda também pode estar presente antes da

transferência. A escolha do número de regiões constantes presentes, se alguma, depende do rastreamento e do sistema de transferência usado. As regiões constantes da cadeia pesada podem ser selecionadas a partir dos isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE. Os isotipos preferidos são IgG1, IgG2 e/ou IgG3. Adicionalmente, o vetor de expressão para a integração específica para o sítio do ácido nucleico que codifica o anticorpo anti-EGFR contém promotores adequados ou sequências equivalentes que direcionam altos níveis de expressão de cada uma das cadeias  $V_H$  e  $V_L$ . A figura 4 ilustra uma maneira possível de planejar o vetor de expressão, embora numerosos outros planejamentos sejam possíveis.

[000206] A transferência dos pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  do vetor de rastreamento pode ser realizada pela clivagem de enzima de restrição e ligação convencionais, tal que cada molécula de vetor de expressão contenha um par codificador de  $V_H$  e  $V_L$ . Preferivelmente, os pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  são transferidos individualmente, entretanto, eles podem também ser transferidos em massa se desejado. Quando todos os pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  selecionados são transferidos para o vetor de expressão, é obtida uma coleção ou biblioteca de vetores de expressão. Modos alternativos de transferência também podem ser usados se desejado. Se o vetor de rastreamento é idêntico ao vetor de expressão, a biblioteca de vetores de expressão é constituída por pares sequências de  $V_H$  e  $V_L$  selecionados durante o rastreamento, que estão situados no vetor de rastreamento/expressão.

[000207] Métodos para transfetar uma sequência de ácido nucleico para uma célula hospedeira são conhecidos na técnica. Para assegurar a integração específica para o sítio, uma recombinase adequada também deve ser fornecida à célula hospedeira. Isso é preferivelmente obtido pela cotransfecção de um plasmídeo que

codifique a recombinase. Recombinases adequadas são, por exemplo, Flp, Cre ou fago  $\Phi$ C31 integrase, usadas junto com um sistema de célula hospedeira/vetor com os sítios de reconhecimento de recombinase correspondentes. A célula hospedeira tanto pode ser transfetada em massa, significando que a biblioteca de vetores de expressão é transfetada para a linhagem celular em uma única reação, obtendo dessa maneira uma linhagem celular policlonal. Alternativamente, a coleção de vetores de expressão pode ser transfetada individualmente para a célula hospedeira, gerando dessa maneira uma coleção de linhagens celulares individuais (cada linhagem celular produz um anticorpo com uma especificidade particular). As linhagens celulares geradas depois da transfecção (individual ou policlonal) são selecionadas quanto a integrantes específicos para o sítio e adaptadas para crescer em suspensão e meio sem soro, se elas já não tiverem essas propriedades antes da transfecção. Se a transfecção foi realizada individualmente, as linhagens celulares individuais são analisadas com relação as suas propriedades de crescimento e produção de anticorpo. Preferivelmente, linhagens celulares com taxas de proliferação e níveis de expressão de anticorpo similares são selecionadas para a geração da linhagem celular policlonal. A linhagem celular policlonal é gerada então pela mistura das linhagens celulares individuais em uma proporção pré-definida. Geralmente, um banco de célula mestre policlonal (pMCB), um banco de célula de pesquisa policlonal (pRCB) e/ou um banco de célula policlonal de trabalho (pWCB) são previstos a partir da linhagem celular policlonal. A linhagem celular policlonal é gerada pela mistura de linhagens celulares individuais em uma proporção pré-definida. A linhagem celular policlonal é distribuída em ampolas gerando dessa maneira um banco de pesquisa de célula policlonal (pRCB) ou um banco de célula mestre (pMCB) a partir do

qual um banco de célula policlonal de trabalho (pWCB) pode ser gerado pelas células expandidas do banco de pesquisa ou mestre. O banco de célula de pesquisa é primariamente para provar os estudos do conceito, nos quais a linhagem de célula policlonal pode não compreender tantos anticorpos individuais quanto à linhagem celular policlonal no banco de célula mestre. Normalmente, o pMCB é expandido posteriormente para preparar um pWCB com propósitos de produção. Uma vez que pWCB é gasto, uma nova ampola do pMCB pode se expandida para fornecer um novo pWCB.

[000208] Uma modalidade da presente invenção é uma linhagem celular policlonal capaz de expressar uma composição de anticorpo anti-EGFR da presente invenção.

[000209] Uma modalidade adicional da presente invenção é uma linhagem celular policlonal na qual cada célula individual é capaz de expressar um par codificador de  $V_H$  e  $V_L$  único e a linhagem de célula policlonal como um todo é capaz de expressar uma coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$ , onde cada par de  $V_H$  e  $V_L$  codifica um anticorpo anti-EGFR. Preferivelmente, a coleção de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  são pares cognatos gerados de acordo com os métodos da presente invenção.

[000210] Uma composição de anticorpo recombinante da presente invenção pode ser produzida pela cultura de uma ampola de um pWCB em um meio apropriado por um período de tempo que permita a expressão suficiente de anticorpo e onde a linhagem de célula policlonal permaneça estável (A janela é de aproximadamente entre 15 dias a 50 dias). Métodos de cultura tais como lote de alimentação ou perfusão podem ser usados. A composição de anticorpo recombinante é obtida do meio de cultura e purificada pelas técnicas convencionais de purificação. A cromatografia de afinidade combinada com etapas de purificação subsequentes, tais como a cromatografia por troca de íon,

interações hidrofóbicas e filtração em gel, tem sido frequentemente usada para a purificação de IgG. Depois da purificação, a presença de todos os membros individuais na composição de anticorpo policlonal é avaliada, por exemplo, pela cromatografia com troca de íon. A caracterização de tal composição de anticorpo é descrita em detalhes no WO 2006/007853 (incorporado aqui por *referência*).

[000211] Um método alternativo de expressar uma mistura de anticorpos em um hospedeiro recombinante está descrito no WO 2004/009618. Esse método produz anticorpos com cadeias pesadas diferentes associadas com a mesma cadeia leve de uma única linhagem celular. Essa abordagem pode ser aplicável se a composição de anticorpo anti-EGFR for produzida a partir de uma biblioteca combinatória.

#### Composições terapêuticas

[000212] Outro aspecto da invenção é uma composição farmacêutica que compreende como ingrediente ativo uma composição de anticorpo anti-EGFR ou um Fab recombinante anti-EGFR ou outra composição de fragmento de anticorpo recombinante anti-EGFR ou uma molécula de ligação biespecífica da invenção. Preferivelmente, o ingrediente ativo de tal composição é uma composição de anticorpo recombinante anti-EGFR como descrita na presente invenção. Tais composições são pretendidas para a melhora e/ou prevenção e/ou tratamento de câncer. Preferivelmente, a composição farmacêutica é administrada a um humano, um animal doméstico ou um animal de estimação.

[000213] A composição farmacêutica compreende ainda um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[000214] Uma composição de anticorpo ou de fragmentos de anticorpos anti-EGFR pode ser administrada dentro de um diluente, veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis, em forma de dosagem unitária. A prática farmacêutica convencional pode ser

empregada para fornecer formulações ou composições adequadas para administrar a pacientes com câncer. Em uma modalidade preferida, a administração é terapêutica, significando que é administrada depois que uma condição de câncer foi diagnosticada. Qualquer via apropriada de administração pode ser empregada, por exemplo, a administração pode ser parenteral, intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intra-nasal, aerossol, supositório ou administração oral. For exemplo, formulações farmacêuticas podem estar na forma de soluções líquidas ou suspensões. Para a administração oral, é necessário estar protegido contra a degradação no estômago. Para formulações intra-nasais, os anticorpos podem ser administrados na forma de pós, gotas nasais ou aerossóis.

[000215] As composições farmacêuticas da presente invenção são preparadas de uma maneira conhecida *per se*, por exemplo, por meio de processos convencionais de dissolução, liofilização, misturação, granulação ou confecção. As composições farmacêuticas podem ser formuladas de acordo com a prática farmacêutica convencional (veja, por exemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20th. Ed.), Ed. A.R. Genaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA e *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York, NY).

[000216] Preferivelmente, as soluções ou suspensões do ingrediente ativo e, especialmente, as soluções ou suspensões aquosas isotônicas, são usadas para preparar as composições farmacêuticas da presente invenção. No caso de composições liofilizadas que compreendem o ingrediente ativo sozinho ou junto com um veículo, tais soluções ou suspensões podem se possível, ser produzidas antes do uso. As composições farmacêuticas podem ser esterilizadas e/ou

podem compreender excipientes, por exemplo, conservantes, estabilizadores, umectantes e/ou agentes emulsificantes, solubilizantes, sais para regulação da pressão osmótica e/ou tampões, e serem preparadas de uma maneira conhecida *per se*, por exemplo, por meio de processos de dissolução ou liofilização convencionais. As ditas soluções ou suspensões podem compreender substâncias que aumentem a viscosidade, tais como carboximetilcelulose de sódio, carboximetilcelulose, dextrano, polivinilpirrolidona ou gelatina.

[000217] As composições para injeção são preparadas de uma maneira rotineira sob condições estéreis; o mesmo se aplica também a introdução em ampolas ou frascos e no fechamento dos recipientes.

[000218] As composições farmacêuticas compreendem entre aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, preferivelmente entre aproximadamente 20% a aproximadamente 90% de ingrediente ativo. As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem estar, por exemplo, em forma de dose unitária, tal como na forma de ampolas, frascos, supositórios, comprimidos, pílulas ou cápsulas. As formulações podem ser administradas a indivíduos humanos em quantidades terapeuticamente ou profilaticamente eficazes (por exemplo, quantidades que previnem, eliminam ou reduzem uma condição patológica) para fornecer o tratamento para uma doença ou condição. A dosagem preferida do agente terapêutico a ser administrado é provavelmente dependente de variáveis tais como a severidade do câncer, o estado de saúde geral do paciente em particular, a formulação dos excipientes do composto e sua via de administração.

#### Usos terapêuticos das composições de acordo com a invenção

[000219] As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem ser usadas para o tratamento ou melhora de uma doença em um mamífero. As condições que podem ser tratadas ou

previstas com as presentes composições farmacêuticas incluem a prevenção e o tratamento de pacientes com câncer que possam ser submetidos ao tratamento terapêutico com uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção.

[000220] Uma modalidade da presente invenção é um método de prevenção, tratamento ou melhora de um ou mais sintomas associados com câncer em um mamífero, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma composição de anticorpo recombinante anti-EGFR da presente invenção ao dito mamífero.

[000221] Uma modalidade adicional da presente invenção é o uso de uma composição de anticorpo recombinante anti-EGFR da presente invenção para a preparação de uma composição para o tratamento, melhora ou prevenção de um ou mais sintomas associados com câncer em um mamífero.

[000222] Preferivelmente, o mamífero nas modalidades acima é um humano, animal doméstico ou animal de estimação.

[000223] Os anticorpos de acordo com a presente invenção são indicados no tratamento de certos tumores sólidos. Com base em vários fatores, incluindo os níveis de expressão de EGFR, entre outros, os seguintes tipos de tumor parecem apresentar as indicações preferidas: mama, ovário, cólon, reto, próstata, bexiga, pâncreas, cabeça e pescoço e câncer de pulmão de células não pequenas.

[000224] Exemplos adicionais de câncer incluem carcinoma e sarcoma. Carcinoma inclui pelo menos os seguintes:

Neoplasmas epiteliais, NOS

Neoplasmas de célula escamosa

Carcinoma de célula escamosa, NOS

Neoplasmas de célula basal

Carcinoma de célula basal, NOS

Papilomas e carcinomas de célula transicional

Adenomas e adenocarcinomas (glândulas)  
Adenomas, NOS  
Adenocarcinoma, NOS  
Linite plástica  
Insulinoma, NOS  
Glucagonoma, NOS  
Gastrinoma, NOS  
Vipoma  
Colangiocarcinoma  
Carcinoma hepatocelular, NOS  
Carcinoma cístico adenoide  
Tumor carcinoide, NOS, do apêndice  
Prolactinoma  
Oncocitoma  
Adenoma de célula de Hurthle  
Carcinoma de célula renal  
Tumor de Grawitz  
Adenomas endócrinos múltiplos  
Adenoma endometrioide, NOS  
Neoplasmas anexiais e de apêndices da pele  
Neoplasmas mucoepidermoides  
Neoplasmas cístico, mucinoso e seroso  
Cistadenoma, NOS  
Pseudomixoma peritoneal  
Neoplasmas ductal, lobular e medular  
Neoplasmas de célula acinar  
Neoplasmas epiteliais complexos  
Tumor de Warthin  
Timoma, NOS  
Neoplasmas gonadais especializados

Tumor do estroma de cordão sexual  
Tecoma, NOS  
Tumor de célula granulosa, NOS  
Arrenoblastoma, NOS  
Tumor de célula de Leydig-Sertoli  
Paragangliomas e tumores do glomus  
Paraganglioma, NOS  
Feocromocitoma, NOS  
Tumor do glomus  
Nevos e melanomas  
Nevo melanocítico  
Melanoma maligno, NOS  
Melanoma, NOS  
Melanoma nodular  
Nevo displásico  
Lentigo maligno melanoma  
Disseminação superficial de melanoma  
Melanoma acrolentiginoso, maligno

[000225] Exemplos de sarcoma incluem. São dados vários nomes diferentes aos sarcomas, baseado no tipo de tecido do qual eles surgem. Por exemplo, osteosarcoma surge do osso, condrosarcoma surge da cartilagem e o leiomiosarcoma surge do músculo liso. Sarcomas de tecidos moles, tais como leiomiosarcoma, condrosarcoma e tumor do estroma gastrintestinal (GIST) são mais comuns em adultos do que em crianças.

[000226] Em conjunto com cada uma dessas indicações, três vias clínicas parecem oferecer potenciais distintos para o sucesso clínico:

[000227] Terapia adjuvante: Na terapia adjuvante, os pacientes podem ser tratados com anticorpos de acordo com a presente invenção em combinação com um agente quimioterapêutico ou

antineoplásico e/ou terapia de radiação. Os alvos primários listados acima serão tratados sob um protocolo pela adição de anticorpos da invenção a uma terapia de primeira e segunda linhas padronizadas e/ou a uma terapia de terceira linha. Os planejamentos do protocolo se dirigirão a eficácia como avaliada pela redução na massa do tumor assim como a habilidade para reduzir as doses usuais da quimioterapia padronizada. Essas reduções de dosagem permitirão uma terapia adicional e/ou prolongada pela redução da toxicidade relacionada à dose do agente quimioterapêutico. Anticorpos anti-EGFR da técnica anterior foram ou estão sendo utilizados em vários testes clínicos adjuvantes em combinação com os agentes quimioterapêuticos ou antineoplásicos adriamicina (Erbitux: carcinoma de próstata avançado), cisplatina (Erbitux: carcinomas avançados de cabeça e pescoço e pulmão), taxol (Erbitux: câncer de mama) e doxorubicina (Erbitux).

[000228] A invenção fornece artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpo da invenção e pelo menos um composto capaz de induzir a diferenciação de células de câncer como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia do câncer. Pela combinação das composições de anticorpo da invenção com agentes conhecidos por induzir a diferenciação terminal de células de câncer, o efeito pode ser adicionalmente aperfeiçoado.

[000229] Pelo menos um composto pode ser selecionado do grupo que consiste em ácido retinóico, ácidos trans-retinóicos, ácidos cis-retinóicos, fenilbutirato, fator de crescimento de nervo, dimetil sulfóxido, forma ativa da vitamina D(3), receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma, 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, hexametileno-bis-acetamida, fator beta de transformação do crescimento, ácido butírico, AMP cíclico e vesnarinona.

Preferivelmente, o composto é selecionado do grupo que consiste em ácido retinoico, fenilbutirato, todos os ácidos trans-retinoicos e a forma ativa da vitamina D.

[000230] Artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpo da invenção e pelo menos um composto quimioterapêutico ou antineoplásico podem ser usados como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia do câncer. O composto quimioterapêutico pode ser selecionado do grupo que consiste em adriamicina, cisplatina, taxol, doxorubicina, topotecan, fluorpirimidina, oxaliplatina e irinotecan.

[000231] Monoterapia: Em conjunto com o uso dos anticorpos de acordo com a presente invenção na monoterapia de tumores, os anticorpos podem ser administrados a pacientes sem um agente quimioterapêutico ou antineoplásico. Os resultados pré-clínicos gerados através do uso de anticorpos de acordo com a presente invenção e discutidos aqui, demonstraram resultados positivos com uma terapia autônoma.

[000232] Agente de Imagem: Através da ligação de um radionuclídeo (por exemplo, ítrio (<sup>90</sup>Y)) a anticorpos de acordo com a presente invenção, espera-se que os anticorpos marcados de acordo com a presente invenção possam ser utilizados como um agente de diagnóstico, para imagem. Em tal papel, os anticorpos da invenção se localizarão em ambos, tumores sólidos assim como lesões metastáticas de células que expressam EGFR. Em conjunto com o uso dos anticorpos da invenção como agentes de imagem, os anticorpos podem ser usados no auxílio do tratamento cirúrgico de tumores sólidos, tanto como um rastreamento pré-cirúrgico quanto como um acompanhamento pós-operatório para determinar se o tumor permanece e/ou retorna. Um anticorpo (<sup>111</sup>In)-Erbitux foi usado como um agente de imagem em um ensaio clínico humano de Fase I em

pacientes que possuem carcinomas de célula escamosa pulmonar não ressecáveis. (Divgi *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 83:97-104 (1991). Os pacientes foram acompanhados com câmara gama anterior e posterior padronizada. Os dados preliminares indicaram que todas as lesões primárias e grandes lesões metastáticas foram identificadas, apesar de apenas metade das pequenas lesões metastáticas (abaixo de 1 cm) serem detectadas.

[000233] Os inibidores de tirosina quinase (TKIs) são moléculas sintéticas, derivadas principalmente de quinazolina, com baixo peso molecular que interagem com o domínio intracelular de tirosina quinase de receptores e inibem a fosforilação do receptor induzida pelo ligante pela competição pelo sítio de ligação de Mg-ATP intracelular. Vários TKIs em desenvolvimento clínico, incluindo Gefitinib (Iressa, ZD1839), Erlotinib (Tarceva, OSI-774), Lapatinib, (Tykerb, GW572016), Canertinib (CI-1033), EKB-569 e PKI-166 são direcionados para EGFR. O tratamento de combinação de TKIs e anti-EGFR mostrou ser benéfico tanto *in vivo* quanto *in vitro* contra células de câncer dependentes de EGFR. Artigos farmacêuticos que compreendem uma composição de anticorpo da invenção e pelo menos um TKI que atinge EGFR podem ser usados como uma combinação para a administração simultânea, separada ou sucessiva na terapia do câncer. Inibidores de molécula pequena adicionais incluem: Sorafenib (raf e múltiplos RTKs), Sunitinib (Multiplos RTKs), Temsirolimus (mTOR), RAD001 (mTOR), e AZD217 (VEGFR2).

[000234] Em outras modalidades, as composições de anticorpo da presente invenção são usadas em combinação com outros anticorpos terapêuticos. Exemplos desses incluem, por exemplo, anticorpos contra HER2 (Herceptin) e VEGF (Avastin). Em outras modalidades, as composições de anticorpo da presente invenção são usadas em combinação com um agente conhecido para estimular células do

sistema imune, tal tratamento de combinação levando a intensificação mediada pelo sistema imune estimulado da eficácia das composições de anticorpo da invenção. Exemplos de tais agentes que estimulam a imunidade incluem, mas não são limitados a interleucinas recombinantes (por exemplo, IL-21 e IL-2).

*Dose e Via de Administração*

[000235] Apesar da dosagem específica dos anticorpos de acordo com a invenção ainda não ter sido determinada, certas considerações de dosagem podem ser determinadas através da comparação com o produto similar (ImClone C225 (Erbitux)) que foi aprovado. O anticorpo C225 é tipicamente administrado em doses na faixa de 5 a 400 mg/m<sup>2</sup>, com as doses mais baixas usadas apenas em conjunto com estudos de segurança. Consequentemente, pode ser esperado que a dosagem em pacientes de anticorpos de acordo com a invenção pode estar nessa faixa ou abaixo, talvez na faixa de 50 a 300 mg/m<sup>2</sup> e ainda permanecer eficaz. A dosagem em mg/m<sup>2</sup>, em oposição a medida de dose convencional em mg/kg, é uma medida baseada na superfície corporal e é uma medida de dosagem conveniente que é designada para incluir pacientes de todos os tamanhos de crianças a adultos.

[000236] A informação disponível da prescrição para Erbitux (Cetuximab) inclui uma infusão inicial IV por 120 minutos de 400 mg/m<sup>2</sup>, seguida por infusões semanais de 250 mg/m<sup>2</sup> por 60 minutos. Essas dosagens são recomendadas para o tratamento autônomo assim como para combinação com terapia de radiação. Para Vectibix (panitumumab) a dose recomendada é de 6 mg/kg administrada por 60 minutos a cada 14 dias.

[000237] A dosagem clínica esperada do anticorpo HuMaxEGFr da Genmab (zalutumumab) é uma dose inicial de 8 mg/kg de HuMax-EGFr, seguida por infusões semanais de uma dose de manutenção até a progressão da doença. A dose de manutenção será ajustada

quando necessário até que o paciente desenvolva uma erupção cutânea que limite a dose, até um máximo de 16 mg/kg de HuMax-EGFr (Dosagens para estudo principal da Fase III, disponíveis a partir da descrição do produto da Genmab).

[000238] A dosagem clínica de composições de anticorpo da presente invenção são provavelmente limitadas pela extensão da erupção cutânea como observada com anticorpos monoclonais anti-EGFR (Erbitux e Vectibix) usados na clínica atual. Os dados de um estudo de seis semanas da toxicologia em macacos Cynomolgus não mostrou sinais de erupção cutânea quando a composição de anticorpo da invenção foi administrada em uma dose equivalente àquela usada para o tratamento com um dos anticorpos monoclonais usados na clínica (exemplo 20). Portanto, as composições de anticorpo da invenção podem ser administradas intravenosamente e com uma dosagem semanal de 250 mg/m<sup>2</sup>, que se traduz em 7,5 mg/kg para um humano com uma superfície corporal de 1,8 m<sup>2</sup> e 60 kg de peso corporal. Adicionalmente, uma dose de ataque inicial de 400 mg/m<sup>2</sup> (traduzida em 12 mg/kg para um humano com uma superfície corporal de 1,8 m<sup>2</sup> e 60 kg de peso corporal) pode ser dada antes da dosagem semanal subsequente.

[000239] Três abordagens de liberação distintas são esperadas serem úteis para a liberação de anticorpos de acordo com a invenção. A liberação intravenosa convencional presumivelmente será a técnica de liberação padronizada para a maioria dos tumores. Entretanto, em relação a tumores na cavidade peritoneal, tais como tumores dos ovários, dutos biliares, outros dutos e semelhantes, a administração intraperitoneal pode demonstrar ser favorável para a obtenção de uma dose alta de anticorpo no tumor e para minimizar a depuração do anticorpo. De uma maneira similar, certos tumores sólidos possuem uma vascularização que é apropriada para a perfusão regional. A

perfusão regional possibilitará a obtenção de uma alta dose do anticorpo no local de um tumor e minimizará a depuração a curto prazo do anticorpo.

[000240] Com qualquer terapêutica baseada na infusão de proteína ou anticorpo, as preocupações com a segurança estão primariamente relacionadas com (i) síndrome de liberação de citocina, isto é, hipertensão, febre, tremores, calafrios, (ii) o desenvolvimento de uma resposta imunogênica ao material (isto é, desenvolvimento de anticorpos humanos pelo paciente para o anticorpo terapêutico ou resposta HAHA ou HACA) e (iii) toxicidade para células normais que expressam o receptor de EGF, por exemplo, hepatócitos que expressam EGFR. Os testes padronizados e o acompanhamento serão utilizados para monitorar cada uma dessas preocupações com a segurança. Em particular, a função hepática será monitorizada frequentemente durante os testes clínicos a fim de avaliar o dano ao fígado, se houver.

#### *Uso diagnóstico*

[000241] Outra modalidade da invenção é direcionada para os kits de diagnóstico. Os kits de acordo com a presente invenção compreendem uma composição de anticorpo anti-EGFR preparada de acordo com a invenção, cuja proteína pode ser marcada com um marcador detectável ou não marcada para a detecção sem marcador. O kit pode ser usado para identificar indivíduos acometidos por câncer com a superexpressão de EGFR.

#### EXEMPLOS

##### Exemplo 1: Clonagem de anticorpos anti-EGFR

##### Imunizações

[000242] Camundongos fêmeas BALB/c, linhagem A ou C57B16 (8 a 10 semanas de idade) foram usados para imunizações com injeções de proteínas purificadas diferentes em adição a células que super-

expressam EGFR.

[000243] Proteínas EGFR comercialmente disponíveis (R&D Systems cat#1095-ER ou Sigma #E3641) foram usadas para algumas das imunizações. Para outras imunizações, foram usados EGFR humano recombinante e EGFRvIII produzidos como proteínas de fusão que consistem em ECD de EGFR ou EGFRvIII e hormônio do crescimento humano (hGH), incluindo também um sítio de clivagem do Vírus do Mosaico do Tabaco (TEV) em adição a um His-tag descrito no Exemplo 10b. Em alguns casos, o ECD de EGFR foi isolado pela clivagem com TEV-protease e subsequente purificação em uma coluna de Níquel.

[000244] A linhagem celular de câncer de cabeça e pescoço humano, HN5 (Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Butler LJ. Br J Cancer. 1981 Jun;43(6):772-85. *Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck*) que expressa aproximadamente  $10^7$  receptores/célula foi usada para as imunizações baseadas em célula. As células foram cultivadas em meio DMAM suplementado com FBS 10% (Soro Fetal Bovino), Glicerol 3 mM, Piruvato de Sódio 5 mM e Penicilina-Estreptomicina 1%. Antes de cada imunização as células foram lavadas em PBS, tripsinizadas com TrypLE e ressuspensas em meio de crescimento. Subsequentemente, as suspensões celulares foram lavadas duas vezes em PBS por centrifugação a 250 Xg por 5 min, remoção e ressuspensão em 15 mL de PBS estéril.

[000245] As células ou o antígeno foram diluídos em PBS e misturados depois 1:1 com Adjuvante de Freund. O adjuvante é usado para intensificar e modular a resposta imune. Para as primeiras imunizações, o Adjuvante Completo de Freund (CFA) foi usado, enquanto que o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) foi usado para as imunizações subsequentes. IFA é uma emulsão de óleo em água

composta por óleos minerais e CFA é IFA ao qual espécies de *Mycobacterium* mortas pelo calor, desidratadas são adicionadas. Ambos os adjuvantes têm efeito de depósito. CFA desencadeia uma persistência a longo prazo da resposta imune e é usado para as primeiras imunizações para intensificar a resposta imune e IFA é usado nas imunizações subsequentes. As emulsões foram testadas pela adição de uma gota sobre uma superfície de vidro com água. Se a gota permanecer como uma gota, a emulsão é estável e as injeções podem ser realizadas. Apenas emulsões estáveis foram administradas nos camundongos.

[000246] Dependendo do esquema (veja Tabela 2), 25 a 100 µg de antígeno ou  $10^7$  células foram usados para cada injeção. No total, os camundongos receberam 4 injeções. Todos os camundongos foram inoculados tanto com 300 µL quanto com 200 µL da emulsão. Dependendo do esquema, as injeções foram realizadas por via subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.).

[000247] No final, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os baços foram removidos e transferidos para um filtro de célula de 74 µm (Corning #136350-3479). As células foram maceradas através do filtro, ressuspensas em RPMI 1640 gelado com FBS 10% e centrifugadas em 300Xg por 5 minutos. O pélete celular foi ressuspenso em RPMI 1640 com FBS 1%, filtrado através de um filtro de seringa de 50 µm (BD #340603) e coletados por centrifugação. O pélete celular foi crio-preservado depois da ressuspensão em FCS com DMSO 10% e as células congeladas foram armazenadas a -80°C até a classificação por FACS. # P59

#### Classificação por FACS de células plasmáticas de murino

[000248] Frascos com os esplenócitos congelados foram descongelados a 37°C e transferidos para tubos de 15 mL com o gelo ainda presente. 10 mL de RPMI gelado, FBS 10% (soro fetal bovino)

foram adicionados por gotejamento ao tubo com turbilhonamento. Depois de uma lavagem em 10 mL de FACS PBS, 5 mL de FACS PBS são adicionados antes da filtração das células através de Filcon 50 µm. As células foram peletizadas e ressuspensas em 1 mL de PBS com FBS 2% (volume final) e coradas com anti-CD43-FITC e anti-CD138-PE de acordo com a diluição específica até uma concentração final de aproximadamente 5 µg/mL. As células foram incubadas a 4°C por 20 min no escuro. Subsequentemente, as células foram lavadas 2 vezes com 2 mL de tampão de FACS. Até 15 mL de FACS PBS foram adicionados. Foi adicionado Iodeto de Propídio (PI) a 1:100 (1 parte de PI para 100 partes de tampão FACS PBS) e as células foram subsequentemente classificadas em placas de PCR de 96 poços, contendo tampão de reação de PCR (veja abaixo) e centrifugadas por 2 min 400 Xg antes das placas serem congeladas a -80°C. As células plasmáticas foram classificadas como positivas para CD43/positivas para CD138 como mostrado na *figura 1*.

#### Ligaçāo de pares cognatos de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>

[000249] A ligação de sequências codificadoras de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> foi realizada sobre células isoladas capturadas como células plasmáticas, que facilitam o pareamento cognato das sequências codificadoras de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>. O procedimento utilizou um procedimento de PCR em duas etapas em uma RT-PCR multiplex com extensão de superposição seguida por uma nested PCR. As misturas de iniciadores usadas no presente exemplo amplificaram apenas as cadeias leves Kappa. Os iniciadores capazes de amplificar as cadeias leves Lambda podem, entretanto, ser adicionados à mistura de iniciadores multiplex e a mistura de iniciadores de nested PCR se desejado. Se os iniciadores para Lambda são adicionados, o procedimento de classificação deve ser adaptado tal que as células positivas para Lambda não sejam excluídas. O princípio da ligação de sequências cognatas de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>

está ilustrado na *figura 2*.

[000250] As placas de 96 poços de PCR produzidas foram descongeladas e as células classificadas serviram como modelo para a RT-PCR multiplex com extensão de superposição. O tampão de classificação adicionado a cada poço antes da classificação de célula isolada continha tampão de reação (OneStep RT-PCR Buffer; Qiagen), iniciadores para RT-PCR (veja Tabela 3) e inibidor de RNase (RNasin, Promega). Isso foi suplementado com OneStep RT-PCR Enzyme Mix (diluição de 25×; Qiagen) e mistura de dNTP (200 µM de cada) para obter uma dada concentração final em um volume de reação de 20 µL. As placas foram incubadas por 30 min a 55°C para permitir a transcrição reversa do RNA de cada poço. Depois da RT, as placas foram submetidas ao seguinte ciclo de PCR: 10 min a 94°C, 35×(40 seg a 94°C, 40 seg a 60°C, 5 min a 72°C), 10 min a 72°C.

[000251] As reações de PCR foram realizadas em um termociclador H20BIT com uma cesta de casca selada (“Peel Seal Basket”) para 24 placas de 96 poços (ABgene), para facilitar um alto rendimento. As placas de PCR foram armazenadas a -20°C depois da ciclagem.

[000252] Para a etapa de nested PCR, as placas de 96 poços foram preparadas com a seguinte mistura em cada poço (reações de 20 µL) para obter a concentração final dada: tampão 1× FastStart (Roche), mistura de dNTP (200 µM cada), mistura de iniciadores para nested (veja *Tabela 4*), Phusion DNA Polymerase (0,08 U; Finnzymes) e FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0,8 U; Roche). Como modelo para a nested PCR, 1 µl foi transferido das reações de PCR multiplex com extensão de superposição. As placas de nested PCR foram submetidas a seguinte termociclagem: 35×(30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 90 seg a 72°C), 10 min a 72°C.

[000253] As reações selecionadas aleatoriamente foram analisadas em um gel de agarose 1% para verificar a presença de um fragmento

de extensão de superposição de aproximadamente 890 pares de bases (pb).

[000254] As placas foram armazenadas a -20°C até o processamento posterior dos fragmentos de PCR.

[000255] Os repertórios de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  de nested PCR foram agrupados sem mistura de pares de doadores diferentes e foram purificados por eletroforese preparatória em gel de agarose 1%. A sequência codificadora da cadeia leve constante kappa humana foi unida por extensão de superposição à região codificadora de  $V_L$  dos produtos de PCR agrupados dos pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  (*figura 3*). A sequência codificadora da cadeia leve constante kappa humana foi amplificada a partir de um plasmídeo que continha a sequência codificadora de um anticorpo humano com uma cadeia leve kappa em uma reação que continha: Phusion Enzyme (2 U; Finnzymes), tampão 1x Phusion, mistura de dNTP (200  $\mu$ M cada), iniciador hKCforw-v2 e iniciador Kappa3' (Tabela 5) e o plasmídeo de modelo pLL138 (10 ng/ $\mu$ L) em um volume total de 50  $\mu$ L. A reação foi submetida à seguinte termociclagem: 25×(30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C, 45 seg a 72°C), 10 min a 72°C. O fragmento de PCR resultante foi purificado por eletroforese preparatória em gel de agarose 1%.

[000256] Os fragmentos de PCR purificados agrupados de cada repertório foram unidos ao fragmento de PCR amplificado e purificado da região que codifica a constante kappa humana (Apêndice 2) pela seguinte junção por PCR com extensão de superposição (volume total de 50  $\mu$ L) contendo: fragmento da região que codifica a constante kappa humana (1,4 ng/  $\mu$ L), fragmento de PCR purificado agrupado (1,4 ng/  $\mu$ L), Phusion DNA Polymerase (0,5 U, Finnzymes) e FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0,2 U, Roche), tampão 1x FastStart (Roche), mistura de dNTP (200  $\mu$ M cada), iniciador mhKCre e conjunto de iniciadores mJH (veja Tabela 5). A reação foi submetida à

seguinte termociclagem: 2 min a 95°C, 25×(30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C), 10 min a 72°C. O fragmento de PCR resultante (aproximadamente 1070 pb) foi purificado por eletroforese preparatória em gel de agarose 1%.

Inserção de pares codificadores cognatos de  $V_H$  e  $V_L$  em um vetor de rastreamento

[000257] A fim de identificar os anticorpos com especificidade de ligação a EGFR, as sequências codificadoras de  $V_H$  e  $V_L$  obtidas foram expressas como anticorpos de extensão completa. Isso envolveu a inserção do repertório de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  em um vetor de expressão e transfecção para uma célula hospedeira.

[000258] Um procedimento de clonagem em duas etapas foi empregado para a geração de um repertório de vetores de expressão contendo os pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$  ligados. Estatisticamente, se o repertório de vetores de expressão contiver dez vezes tantos plasmídeos recombinantes quanto o número de produtos de PCR de  $V_H$  e  $V_L$  cognatas pareadas usadas para a geração do repertório de rastreamento, há 99% de probabilidade de que todos os pares de genes únicos sejam representados. Portanto, se 400 fragmentos por extensão de superposição do gene V foram obtidos, um repertório de pelo menos 4000 clones foi gerado para o rastreamento.

[000259] Resumidamente, o produto de PCR purificado dos repertórios de pares codificadores de  $V_H$  e  $V_L$ , unidos a região codificadora constante kappa humana, foi clivado com as DNA endonucleases *Xhol* e *NotI* nos sítios de reconhecimento introduzidos nas terminações dos produtos de PCR. Os fragmentos clivados e purificados foram ligados ao vetor de expressão de IgG de mamífero digerido com *Xhol* /*NotI*, OO-VP-002 (*figura 4*) pelos procedimentos de ligação padronizados. A mistura de ligação foi eletroporada em *E. coli* e adicionada a placas 2xYT contendo o antibiótico apropriado e

incubada a 37°C por uma noite. O repertório amplificado de vetores foi purificado das células recuperadas das placas usando métodos de purificação de DNA padronizados (Qiagen). Os plasmídeos foram preparados pela inserção de fragmentos promotor-líder pela clivagem usando as endonucleases *Ascl* e *Nhel*. Os sítios de restrição para essas enzimas estavam localizados entre os pares de genes codificadores de  $V_H$  e  $V_L$ . Depois da purificação do vetor, um fragmento promotor-líder bidirecional de mamífero digerido com *Ascl* / *Nhel* foi inserido nos sítios de restrição de *Ascl* e *Nhel* por procedimentos de ligação padronizados. O vetor ligado foi amplificado em *E. coli* e o plasmídeo foi purificado usando métodos padronizados. O repertório gerado de vetores de rastreamento foi transformado em *E. coli* por procedimentos convencionais. As colônias obtidas foram consolidadas em placas mestre de 384 poços e armazenadas. O número de colônias arranjadas excedeu o número de produtos de PCR de entrada em pelo menos 3 vezes, dando, portanto, 95% de probabilidade da presença de todos os pares de gene V únicos obtidos.

#### Rastreamento por ligação para domínio extracelular de EGFR

[000260] Em geral, o rastreamento foi feito como um procedimento em duas etapas. As bibliotecas de anticorpo foram rastreadas quanto à reatividade a proteína EGFR recombinante com ELISA depois do que FMAT (FLISA) foi usado como uma abordagem baseada em célula, com a linhagem celular NR6wtEGFR, para a detecção de anticorpos para EGFR que se ligam a EGFR expresso na superfície celular. Para as bibliotecas 101 e 108/109 (Tabela 2), ELISA foi realizado com EGFR recombinante representando o domínio extracelular de EGFR.

[000261] Resumidamente, para ELISA, placas Nunc maxisorb (cat. No. 464718) foram revestidas com 1 µg/mL de proteína (produzida no

laboratório), diluída em PBS a 4°C por uma noite. Antes do bloqueio em 50 µL de Leite-PBS-T 2%, as placas foram lavadas uma vez com PBS + Tween 20 0,05 % (PBS-T). As placas foram lavadas uma vez com PBS-T, 20 µL de Leite-PBS-T 2% e 5 µL dos sobrenadantes dos transfectantes FreeStyle CHO-S (veja abaixo) foram adicionados e incubados por 1 ½ hora em R.T, depois do que as placas foram lavadas uma vez com PBS-T 20 µL por poço. O anticorpo secundário (HRP- IgG anti-humana de cabra, Jackson, cat no 109-035-097) diluído 1:10000 em leite-PBS-T 2% foi adicionado para detectar os anticorpos ligados aos poços e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez em PBS-T antes da adição de 25 µL de substrato (Kem-en-tec Diagnostics, cat no 4390) que foi incubado por 5 min 25 µL de ácido sulfúrico 1M foram adicionados depois da incubação para parar a reação. O sinal específico foi detectado em um leitor de ELISA a 450 nm.

[000262] Para a detecção FMAT baseada em célula de anticorpos anti-EGFR, células SKBR-3 (ATCC #HTB-30) ou NR6wtEGFR (Welsh *et al*, 1991, J Cell Biol, 114, 3, 533-543) foram mantidas em meio de crescimento como descrito. As células foram contadas e diluídas para 125.000 células/mL com o anticorpo anti-IgG humana (H-L) de cabra conjugado com Alexa-647 (Molecular probes No. A21445, lote no. 34686A) diluído 1:40.000. Um total de 20 µL dessa suspensão foi transferido para placas Nunc de 384 poços de fundo claro. Subsequentemente, 10 µL do sobrenadante da transfecção foram adicionados às células. O sinal de FMAT da reação foi medido depois de 6 a 10 horas de incubação.

[000263] Os dados do rastreamento indicam que 221 (4,8%) do total de clones foram positivos em ELISA. 93 (2,0%) desses clones também foram positivos em FMAT. No total, 220 (4,8%) dos clones foram positivos em FMAT e entre esses 27 (220-93) positivos somente para

o antígeno de superfície celular. A biblioteca 111 foi rastreada de modo similar, mas como o procedimento de imunização foi feito para gerar anticorpos específicos para o mutante por deleção do receptor EGFRvIII de EGFR, os rastreamentos por ELISA incluíram ensaios para detectar ambos, EGFR e EGFRvIII de tipo selvagem. Sete clones foram identificados serem específicos para EGFRvIII em ELISA e, interessantemente, esses clones foram negativos na coloração de células que expressam wtEGFR em FMAT. 13 clones foram identificados serem positivos para wtEGFR em FMAT e ELISA, mas não para EGFRvIII, que eram únicos para essa biblioteca comparada com as bibliotecas 101 e 108/109. Todos os clones positivos em ELISA foram selecionados para análise posterior.

**Análise de sequência e seleção de clones**

[000264] Os clones identificados como específicos para EGFR em ELISA foram recuperados das placas mestres originais (formato de 384 poços) e consolidados em novas placas. O DNA foi isolado dos clones e submetido ao sequenciamento do DNA dos genes V. As sequências foram alinhadas e todos os clones únicos foram selecionados. Alinhamentos múltiplos das sequências obtidas revelou a singularidade de cada clone em particular e permitiu a identificação de anticorpos únicos. Depois da análise de sequência de 220 clones, 70 clusters de sequência de anticorpo geneticamente distinta foram identificados. Cada cluster de sequências relacionadas provavelmente foi derivado de hipermutações somáticas de um clone precursor comum. No total, um a dois clones de cada cluster foi escolhido para a validação da sequência e especificidade. Sequências selecionadas de sequências variáveis de anticorpo são mostradas no Apêndice 1. As sequências de nucleotídeos incluem sítios de restrição em ambas as terminações. Consequentemente, as sequências de aminoácidos traduzidas correspondentes (usando a terceira fase de leitura da

sequência de DNA) incluem na terminação N, dois aminoácidos que não formam parte das sequências de VH e VL de acordo com a definição IMGT (Lefranc *Et al* (2003) *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*. Dev. Comp Immunol 27, 55-77). As sequências de VL mostradas incluem todas a mesma região Constante Kappa humana, que começa com os aminoácidos – TVAAP – e termina na terminação C com – NRGEC. Para os propósitos da presente invenção, a expressão sequência de VL quando se referir a um anticorpo específico exclui a região Constante Kappa e os dois aminoácidos N terminais (LA-). A expressão sequência de VH quando se referir a um anticorpo específico exclui os dois aminoácidos N terminais (RA-).

#### *Validação da sequência e especificidade*

[000265] A fim de validar os clones que codificam o anticorpo, o plasmídeo de DNA foi preparado e a transfecção de células FreeStyle CHO-S (Invitrogen) em escala de 2 mL foi realizada para expressão. O sobrenadante foi coletado 96 horas depois da transfecção. Os níveis de expressão foram avaliados com ELISA anti-IgG padronizado e a especificidade foi determinada por ELISA específico para EGFR e EGFRvIII. 85% dos clones foram mostrados ter a especificidade e a sequência corretas.

#### Rastreamento para efeitos antiproliferativos

[000266] O dano celular resultará inevitavelmente na perda da habilidade da célula em manter e fornecer energia para a função metabólica da célula e o crescimento. Ensaios de atividade metabólica são baseados nessa premissa. Geralmente, eles medem a atividade mitocondrial. O Reagente de Proliferação Celular WST-1 (Roche, No. Cat. 11 644 807 001) é um substrato pronto para uso que mede a atividade metabólica de células viáveis. Portanto, é presumido que a

atividade metabólica se correlacione com o número de células viáveis. Nesse exemplo, o ensaio com WST-1 foi usado para medir o número de células metabolicamente ativas depois do tratamento com sobrenadantes de cultura celular que contêm anticorpos anti-EGFR diferentes.

[000267] Antes de realizar o ensaio com WST-1, volumes diferentes de sobrenadantes com 2 mL (0, 10, 25, 50 e 150 µL) foram transferidos para poços apropriados em uma placa de 96 poços. Células HN5 foram lavadas com 1xPBS e separadas pela tripsinização com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de meio completo foram adicionados e as células foram centrifugadas a 300 xg (1200 rcf) por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em DMEM + FBS 0,5%. As células foram contadas e sua concentração ajustada e 1500 células foram adicionadas aos poços com sobrenadantes, tal que cada poço continha 200 µL de meio no total. As placas foram incubadas por 4 dias em uma incubadora umidificada a 37°C. Depois, 20 µL de reagente WST-1 foi adicionado por poço e as placas incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram então transferidas para um agitador orbital de placa e deixadas por mais uma hora. A absorbância foi medida a 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em um leitor de ELISA. A diferença nos níveis de células metabolicamente ativas (MAC) foi calculada como um percentual dos sobrenadantes de controle como se segue:

$$\%MAC = \left( 1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{meio})}{(OD_{não\ trat.} - OD_{meio})} \right) \times 100$$

[000268] Esses valores foram usados então como a base para a análise hierárquica supervisionada de cluster (agrupados com base na reatividade em ELISA) realizada usando o programa gratuito Cluster e TreeView.

[000269] É preferível ser capaz de rastrear anticorpos funcionais em um estágio precoce no processo de seleção de anticorpo. Os sobrenadantes da cultura de 83 transfecções de 2 mL foram usados para rastrear funções inibitórias do crescimento em um ensaio de proliferação usando células HN5 em FBS 0,5%. Os resultados foram visualizados pela análise hierárquica simples de cluster. Como pode ser visto na análise de cluster (*figura 5*), vários sobrenadantes foram encontrados diminuir o número de células HN5 metabolicamente ativas (cinza escuro) em uma maneira dependente da concentração (Cluster 2). Similarmente, alguns sobrenadantes aumentaram o número de células HN5 metabolicamente ativas (cinza claro) em uma maneira dependente da concentração (Clusters 1, 3 e 4). Uma observação interessante foi de que os sobrenadantes, que diminuíram o número de células HN5 metabolicamente ativas, tinham reatividade 2 (setas pretas) enquanto que os sobrenadantes que aumentaram o número de células HN5 metabolicamente ativas tiveram reatividade 1 (setas cinza). Os sobrenadantes com reatividade 2 foram positivos em ambos os ELISAs para wtEGFR e EGFRvIII, enquanto que os sobrenadantes com reatividade 1 tinham reatividade apenas frente a wtEGFR. Portanto, tais análises podem fornecer relacionamentos entre a reatividade do anticorpo em ELISA e a funcionalidade em ensaios celulares.

#### Reparo do clone

[000270] Quando se usa a abordagem de PCR multiplex, certo grau de ativação cruzada ("") de família intra e inter-gene-V é esperado devido a degeneração do iniciador e o alto grau de homologia. A ativação cruzada introduz aminoácidos que não ocorrem naturalmente na estrutura da imunoglobulina com várias consequências em potencial, por exemplo, alterações estruturais e imunogenicidade aumentada, todas resultando em uma atividade terapêutica diminuída.

[000271] A fim de eliminar essas desvantagens e garantir que os clones selecionados espelhem a resposta imune humoral natural, tais mutações por ativação cruzada foram corrigidas em um processo chamado de reparo de clone.

[000272] Na primeira etapa do procedimento de reparo de clone, a sequência  $V_H$  foi amplificada por PCR com um conjunto de iniciadores contendo a sequência correspondente a do gene de  $V_H$  do clone de interesse que o originou, corrigindo dessa maneira quaisquer mutações introduzidas por ativação cruzada. O fragmento de PCR foi digerido com *Xhol* e *Ascl* e ligado de novo no vetor de expressão de mamífero digerido com *Xhol* / *Ascl* (*figura 4*), usando procedimentos de ligação convencionais. O vetor ligado foi amplificado em *E. coli* e o plasmídeo foi purificado por métodos padronizados. A sequência de  $V_H$  foi sequenciada para verificar a correção e o vetor foi digerido com *Nhel/NotI* para prepará-lo para a inserção na cadeia leve.

[000273] Na segunda etapa, a cadeia leve completa foi amplificada por PCR com um conjunto de iniciadores contendo a sequência correspondente a do gene de  $V_H$  do clone de interesse que o originou, corrigindo dessa maneira quaisquer mutações introduzidas por ativação cruzada. O fragmento de PCR foi digerido com *Nhel* / *NotI* e ligado no vetor que contém  $V_H$  preparado acima. O produto de ligação foi amplificado em *E. coli* e o plasmídeo foi purificado por métodos padronizados. Subsequentemente, a cadeia leve foi sequenciada para verificar a correção.

[000274] No caso onde a região constante Kappa de um clone selecionado contém mutações, introduzidas durante a amplificação dos genes, ela é substituída por uma região constante não mutada. Isso é feito em uma PCR superposta onde o gene de  $V_L$  reparado (amplificado sem a região constante) foi fundido a uma região constante com a sequência correta (obtida em uma PCR separada). A

sequência completa é amplificada e clonada no vetor que contém  $V_H$  como descrito acima e a cadeia leve reparada é sequenciada para verificar a correção.

**Tabela 2** Esquemas de imunização usados para gerar o material de partida para a clonagem anti-EGFR

Esquema, Grupo de camundongo	Linhagem	Injeção 1	Injeção 2	Injeção 3	Injeção 4	Término
101	Balb/c	Dia 1 25 µg rhEGFR (R&D systems 1095-ER) CFA s.c.	Dia 35 25 µg rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Dia 56 25 µg rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Dia 70 25 µg rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Dia 73
108	Balb/c	Dia 1 $1 \times 10^7$ células HN5 CFA i.p.	Dia 28 25 µg rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Dia 42 $1 \times 10^7$ células HN5 IFA i.p.	Dia 56 25 µg rhEGFR*, (Symphogen) IFA s.c.	Dia 59
109	Balb/c	Dia 1 $1 \times 10^7$ células HN5 CFA i.p.	Dia 28 25 µg rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Dia 42 $1 \times 10^7$ células HN5 IFA i.p.	Dia 56 25 µg rhEGFR* (Symphogen) PBS i.v.	Dia 59
111	Balb/c	Dia 1 25 µg rhEGFR* (Symphogen) CFA s.c.	Dia 28 25 µg rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Dia 42 25 µg rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Dia 56 25 µg rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Dia 59

Tabela 2 -continuação-

<b>Esquema, Grupo de camundongo</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Injeção 1</b>	<b>Injeção 2</b>	<b>Injeção 3</b>	<b>Injeção 4</b>	<b>Término</b>
118	Balb/c	Dia 1 1x10 <sup>7</sup> células HN5 CFA i.p.	Dia 29 100 µg rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Dia 44 1x10 <sup>7</sup> células HN5 IFA i.p.	Dia 58 25 µg rhEGFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	Dia 61
119	C57B	Dia 1 1x10 <sup>7</sup> células HN5 CFA i.p.	Dia 29 100 µg rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Dia 44 1x10 <sup>7</sup> células HN5 IFA i.p.	Dia 58 25 µg rhEGFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	Dia 61

Tabela 3 Mistura de iniciador de RT-PCR multiplex com extensão de superposição

<b>Nome do iniciador</b>	<b>Conc (nM)</b>	<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID</b>
mHCreV1	0,2	GACSGATGGGCCCTTGGTGG	1
mKappar1	0,2	GCTGTAGGTGCTGTCTTGCG	2

Tabela 3 -continuação-

<b>Nome do iniciador</b>	<b>Conc (nM)</b>	<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID</b>
<b>mVH set</b>			
mVH A	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCARCTGCARCA GYCTG	3
mVH B	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGMAGCTKGTKGAGTC	4
mVH C	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTKMAGGAGTC	5
mVH 8	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGGTTACTCTGAAAGAGTC	6
mVH 9	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGATCCAGTTGGTGCA GTCTG	7
<b>mVK set</b>			
mVK D	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAYATCCAGATGACHCARWCT	8
mVK E	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCRACATTGTGMTGACHCAGTC	9
mVK F	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCSAMATTGTKCTSACCCARTCTC	10
mVK 1-2	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATTTGTGATGACBCARRCT	11

W=A/T, R=A/G, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, H=ACT, B=GCT; Conc. – concentração final.

Tabela 4 Conjunto de iniciadores de nested PCR

Nome do iniciador	Conc (nM)	Sequência	SEQ ID
mHCre1-ext	0,2	GGACAGGGMTCCA KAGTTCCADKT	16
<b>hmJK set</b>			
hmJK1-v2	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTCGTTGATTCCAGCTTGGTG	17
hmJK2-v2	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTCGTTTATTCCAGCTTGGTC	18
hmJK4-v2	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTCGTTTATTCCAACTTGTC	19
hmJK5-v2	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTCGTTCAGCTCCAGCTTGGTC	20

K=G/T, M=A/C, D=AGT; Conc. – concentração final.

Tabela 5 Conjunto de iniciadores de junção da constante Kappa

Iniciador	Conc. (nM)	Sequência	SEQ ID
<b>Amplificação da constante kappa humana</b>			
hKCforw-v2	0,2	GAACTGTGGCTGCACCATCTGTC	21
Kappa3'	0,2	ACCGCCTCCACCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG	22

Tabela 5 -continuação-

Iniciador	Conc. (nM)	Sequência	SEQ ID
<b>Junção por extensão de superposição</b>			
mhKcrev	0,2	ACCGCCTCCACC GGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT	23
<b>mJH set</b>			
mJH1	0,2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	12
mJH2	0,2	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	13
mJH3	0,2	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCA GAGTCCC	14
mJH4	0,2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC	15

Exemplo 2: Produção de anticorpos anti-EGFR de mamífero

[000275] O sistema de expressão FreeStyle MAX CHO (Invitrogen) foi usado para a expressão transitória de anticorpos anti-EGFR. Os anticorpos foram expressos em um volume de 200 a 2000 mL.

[000276] Aproximadamente 24 horas antes da transfeção, as células CHO-S foram passadas para atingir uma concentração celular de  $0,5 \times 10^6$  células/mL. O plasmídeo (12,5 µg por mL de meio de cultura celular) foi diluído em meio sem soro OptiPro e misturado com uma solução de reagente FreeStyle MAX Transfection como recomendado pelo fornecedor. Os reagentes de transfeção foram transferidos para a cultura celular e o sobrenadante foi coletado 6 dias mais tarde.

[000277] Os anticorpos expressos foram purificados a partir do sobrenadante da cultura usando uma etapa de cromatografia de afinidade empregando uma coluna de Proteína A-Sefarose (MabSelect Sure, GE Health Care) para purificação de moléculas de IgG1. Os anticorpos foram eluídos da coluna usando 0, 1M Glicina, 2,7. As frações contendo os anticorpos, determinadas pelas medidas de absorbância a 280 nm, foram agrupadas e dialisadas contra acetato de sódio 5 mM, NaCl 150 mM, pH 5. As amostras de anticorpo purificado foram testadas quanto à presença de endotoxina pelo ensaio LAL.

Exemplo 3: Determinação de especificidades de epítopo*ELISA de competição com anticorpos de referência*

[000278] Com o uso de anticorpos de *referência* para conhecer domínios de EGFR como publicado em (J.R.Cochran et. al., JIM 2004: 287: 147-158), foi desenvolvido um ELISA de competição, que poderia distinguir entre os epítopos de ligação de anticorpos anti-EGFR pela incubação com um reagente secundário que fosse específico para a região Fc humana de anticorpos anti-EGFR e que não exibisse reatividade cruzada com Fc de IgG de camundongo ou rato. O ELISA foi

adaptado a partir das descrições publicadas em Ditzel *et al.*, 1995, The Journal of Immunology, Vol 154 Issue 2 893-906.

[000279] Um ELISA de bloqueio de epítopo foi realizado pela diluição de antígeno para receptor de EGFR de extensão completa até 0,5 µg/mL em PBS; e revestindo com 50 µl/poço de ELISA por uma noite a 4°C. Na manhã seguinte, os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados por uma hora com PBS-T-BSA 1% em temperatura ambiente seguido pela lavagem duas vezes em PBS-T. Depois, 25 µl de mAbs de *referência* de murino ou rato foram adicionados a poços de ELISA independentes em uma diluição conhecida de experimentos anteriores para fornecer 200 vezes a ligação máxima ao antígeno. Depois de 15 min, 25 µl de anticorpos anti-EGFR foram adicionados em uma concentração de 2 µg/mL aos poços pré-incubados com anticorpos de *referência* ou poços contendo 25 µl de PBS. Isso deu uma concentração final de 1 µg/mL de anticorpo anti-EGFR e 100 vezes a ligação máxima ao antígeno de anticorpos de *referência* depois da mistura. Os anticorpos foram incubados por 45 min em temperatura, depois do que os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. Um conjugado secundário anti-IgG humana de cabra-HRP foi diluído 1:3000 e 50 µl foram adicionados a cada poço seguido por 30 min de incubação em temperatura ambiente. Finalmente, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T e as placas foram desenvolvidas pela adição de 50 µl/poço de TMB e lidas a 620 nm a cada 5-15-30 min O grau de inibição foi calculado a partir da fórmula: % de inibição = (1-(OD competição/OD sem competição (PBS))) x 100.

[000280] Reagentes de ELISA:

- 1) Tampão de revestimento: 1 x PBS; Gibco cat:20012-019
- 2) Antígenos: EGFR de tipo selvagem de extensão completa purificado de células A431; Sigma E3641

- 3) Placa de ELISA: NUNC Maxisorp; cat: 442404
- 4) Tampão de bloqueio/diluição: BSA 1% em PBS-T (PBS-T-BSA 1%)
- 5) Tampão de lavagem: 1 x PBS/Tween 20 0,05% (PBS-T)
- 6) Controle positivo: Erbitux (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, Catálogo #: 018964; Cetuximab), Vectibix (Amgen Inc, One Amgen Center Drive, Thousand Oaks CA 91320-1799, USA, Cat # 3241400; Panitumumab)
- 7) Anticorpos de *referência*:
- ICR10 (rato), Abcam, Ab231
  - 199,12 (murino), Lab Vision Ab-11, MS-396-PABX
  - EGFR.1 (murino), Lab Vision Ab-3, MS-311-PABX
  - H11 (murino), Lab Vision Ab-5, MS-316-PABX
  - B1D8 (murino), Lab Vision Ab-16, MS-666-PABX
  - 111,6 (murino), Lab Vision Ab-10, MS-378-PABX
  - 225 (murino), Lab Vision Ab-2, MS-269-PABX
  - 528 (murino), Lab Vision Ab-1, MS-268-PABX
- 8) Conjugado anti-IgG humana de cabra-HRP; Serotec, Star 106P
- 9) TMB Plus; KemEnTec, cat# 4390L
- 10) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M

[000281] O resultado do ELISA de competição é mostrado na *figura 6*. Ensaios ELISA de competição foram empregados para classificar sobrenadantes de anticorpo anti-EGFR de acordo com a especificidade do domínio dos anticorpos de *referência* usados surgidos contra o domínio extracelular de EGFR. Valores de inibição entre 50 a 100% foram tomados como uma indicação de competição significativa entre pares de anticorpo que se ligam a epítopos superpostos ou epítopos em íntima proximidade sobre o antígeno, enquanto que valores de inibição abaixo de 50% indicaram que os

epítopos reconhecidos pelos pares de anticorpos não estavam em íntima proximidade, resultando em impedimento estérico diminuído . Os anticorpos anti-EGFR foram verificados se ligar a uma variedade de epítopos sobre o ECD de EGFR incluindo o domínio I, II e III. Para alguns anticorpos, essa análise pode não distinguir se o mAb específico foi direcionado contra o domínio I ou domínio II. Tais especificidades foram marcadas como domínio I/II. Alguns anticorpos adicionais pareceram ligar epítopos únicos que não puderam ser deduzidos posteriormente no ELISA de competição empregado (Por exemplo, clones 1229 & 1320, figura 6). É possível que alguns desses anticorpos sejam direcionados contra o domínio IV para o qual nós não temos qualquer *referência* de reatividades de anticorpo. Interessantemente, anticorpos para o domínio III podem adicionalmente ser divididos em quatro subgrupos baseado nos padrões de competição diferentes obtidos com os anticorpos de *referência* de murino testados contra esse domínio. O Grupo I consistiu apenas do mAb 992 que foi verificado competir pela ligação com os anticorpos de *referência* Ab1 & Ab2. O grupo II consistiu em mAbs 1024 e 1042, que eram ambos derivados do mesmo rearranjo de Ig e, consequentemente, mostraram homologia de sequência muito próxima a nível de DNA e aminoácidos. Esses dois anticorpos foram verificados competir apenas pela ligação com Ab2. O grupo III consistiu em mAbs 1030, 1208 & 1227, que competiram pela ligação com os anticorpos de *referência* Ab1, Ab5 & Ab10, Finalmente, o grupo IV consistiu em mAb 1254, que competiu pela ligação com todos os anticorpos de *referência* usados para o domínio III Ab1, Ab2, Ab5 & Ab10.

*Análise de competição para epítopos distintos com anticorpos de referência ou da mesma espécie usando a tecnologia da ressonância de plasma de superfície*

[000282] A análise SPR foi realizada em uma máquina Biacore 3000 contendo quatro fluxos celulares. Um chip CM5 da Biacore foi conjugado com 10.000 unidades de Ressonância (Ru) de anticorpo policlonal anti-His aos fluxos celulares 1 a 4 de acordo com as instruções do fabricante. Usando uma taxa de fluxo de 5 µL/min, 15 µL de 6xHis EGFR ECD em uma concentração de 20 µg/mL foram injetados e capturados em todos os quatro fluxos celulares aos quais o anticorpo policlonal anti-His tinha sido conjugado. Imediatamente depois da injeção do antígeno, a ligação máxima do mAb anti-EGFR sem competição foi estabelecida em cada fluxo celular durante uma corrida de *referência*. Resumidamente, 5 µL de anticorpo em uma concentração de 40 µg/mL, foram injetados sobre todas as células do fluxo com EGFR capturado seguido pela extração do complexo anticorpo/ antígeno com uma lavagem em pH baixo ácido (10 seg, de tempo de contato com Glicina-HCl 10 mM, pH 2). Depois da determinação da ligação máxima do anticorpo anti-EGFR a cada fluxo celular, um corrida de competição foi realizada durante o mesmo ciclo Biacore,. Os fluxos celulares foram saturados primeiro com antígeno de ECD de EGFR pela injeção de diferentes anticorpos de *referência* ou de anticorpos anti-EGFR em fluxos celulares separados usando o mesmo antígeno das condições de saturação delineadas acima. Essa etapa foi imediatamente seguida por uma segunda injeção de anticorpo anti-EGFR sobre o fluxo celular saturado com antígeno de EGFR e o anticorpo de competição para minimizar a dissociação ou do antígeno ou do anticorpo de bloqueio. Depois, os complexos anticorpo/antígeno fora extraídos com uma lavagem em pH baixo ácido (10 seg, de tempo de contato com Glicina-HCl 10 mM, pH 2) e o ciclo completo que começou com a corrida de *referência* foi repetido com um novo anticorpo anti-EGFR. O grau de inibição dos anticorpos anti-EGFR testados foi determinado pela comparação do valor de Ru

Max do anticorpo anti-EGFR individual antes e depois da competição pela introdução de pontos repórteres registrados dois segundos antes e depois da injeção de cada amostra. Um exemplo de um ciclo Biacore é mostrado na *figura 7*.

Reagentes:

1. chip CM5; Biacore, Cat. No. BR-1000-14
2. NHS; Biacore BR-1000-50
3. EDC; Biacore BR-1000-50
4. Tampão acetato 10mM pH 4.5; Biacore, Cat. No. BR-1003-50
5. AnticorpoTetra-His (sem BSA); Qiagen, Cat. No. 34670
6. Etanolamina, 1,0M pH 8.5; Biacore BR-1000-50
7. Tampão de corrida 10 x HBS-EP: HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensoativo P20 0,005% v/v
8. Antígeno: Domínio extracelular de EGFR recombinante humano produzido em laboratório com 6xHis.
9. 10 mM Glicina HCl pH 2.0
10. Anticorpos de referência:
  - ICR10 (rato), Abcam, Ab231
  - 199,12 (murino), Lab Vision Ab-11, MS-396-PABX
  - EGFR.1 (murino), Lab Vision Ab-3, MS-311-PABX
  - H11 (murino), Lab Vision Ab-5, MS-316-PABX
  - B1D8 (murino), Lab Vision Ab-16, MS-666-PABX
  - 111,6 (murino), Lab Vision Ab-10, MS-378-PABX
  - 225 (murino), Lab Vision Ab-2, MS-269-PABX
  - 528 (murino), Lab Vision Ab-1, MS-268-PABX

[000283] Para confirmar a análise do epítopo obtido no ELISA de competição e para realizar uma análise posterior do epítopo pela competição entre espécies iguais de pares de anticorpo anti-EGFR, um ensaio de competição baseado na ligação do anticorpo medida em

tempo real pela ressonância de plasma de superfície foi estabelecido. O mapa de epítopo obtido dos clones anti-EGFR testados contra o painel de anticorpos de *referência* é mostrado na figura 8 abaixo. Os valores de inibição entre 50 a 100% foram tomados como uma indicação de competição significativa entre pares de anticorpo que se ligam a epítopos superpostos ou epítopos em íntima proximidade sobre o antígeno, enquanto que valores de inibição abaixo de 50% indicaram que os epítopos reconhecidos pelos pares de anticorpo não estavam em íntima proximidade resultando em impedimento estérico diminuído. Valores de inibição abaixo de 25% não foram incluídos na análise de epítopos superpostos, por que eles foram julgados representar inibição não significativa. Todos os anticorpos testados, exceto 1320, foram encontrados competir com um ou mais dos anticorpos de *referência* empregados, indicando que 1320 era direcionado contra um epítopo desconhecido para o qual nós não temos qualquer *referência* de reatividades de anticorpo. Os anticorpos totalmente humanizados ou humanizados Vectibix e Erbitux foram incluídos na análise e foram encontrados se ligar a epítopos superpostos. Os dados obtidos de ambas as análises ELISA competitivo e SPR competitiva, geralmente, se correlacionaram bem com relação à especificidade de domínio estabelecida dos anticorpos anti-EGFR. Entretanto, diferenças discretas no padrão de competição entre anticorpos de *referência* individuais foram observadas algumas vezes nos dois ensaios, talvez devido ao fato de que o ensaio ELISA de competição empregou o antígeno para o receptor de EGFR de extensão completa enquanto que o ensaio SPR competitivo usou o domínio extracelular recombinante de EGFR.

[000284] Depois que o mapeamento de epítopo de anticorpos anti-EGFR foi confirmado em dois ensaios de competição diferentes, a análise de competição de combinações da mesma espécie de pares

de anticorpos anti-EGFR foi investigada para resolver quais pares de anticorpos estavam reconhecendo epítópos distintos e se os pares de anticorpo que reconhecem epítópos superpostos podiam ser divididos em clusters de epítópos. O resultado desta análise é mostrado na figura 9. Novamente nessa análise, valores de inibição entre 50 a 100% foram tomados como indicação de competição significativa entre pares de anticorpos que se ligam a epítópos superpostos. Esse critério pareceu válido, já que os anticorpos testados contra eles mesmos e, consequentemente, que reconhecem epitópos superpostos completos resultaram em valores entre 70% a 100% de inibição como mostrado na figura 9. Adicionalmente, esta observação ilustrou que a dissociação tanto do antígeno quanto de pares de anticorpo dentro do prazo da análise não pareceu ter um impacto sobre o resultado do experimento para os anticorpos testados. Pelo agrupamento de anticorpos de acordo com a especificidade presumida pelo domínio ECD de EGFR determinada em seções anteriores, os anticorpos que se ligam exclusivamente ao domínio I ou tanto ao domínio I quanto II (I/II) foram encontrados se agrupar principalmente com anticorpos membros com a mesma especificidade e não com anticorpos membros que reconhecem o domínio III. Igualmente, os anticorpos para o domínio III foram encontrados competir pela ligação apenas com anticorpos membros que reconhecem o domínio III e não com anticorpos que reconhecem os domínio I ou I/II de EGFR. Embora os dois anticorpos para do domínio III, 1024 & 1042, derivados do mesmo rearranjo de Ig tenham sido encontrados reconhecer epítópos superpostos, combinações de matrizes tanto de 1024 quanto de 1042 com 992 ou 1030 não foram encontradas resultar em competição significativa. Consequentemente, foi concluído que os anticorpos 992, 1030 & 1024/1042 reconheceram três epítópos não superpostos sobre o domínio III de ECD de EGFR. Finalmente, o mAb 1320 foi

encontrado competir pela ligação com os mAbs 1024 e 1049, ambos direcionados contra o domínio III e com nenhum dos outros anticorpos testados para o domínio III (a competição de 1320 com 1042 não foi determinada). Consequentemente, foi presumido que o mAb 1320 estava ligado na periferia do domínio III sobre o domínio extracelular de EGFR. Um resumo das especificidades dos epítopos pode ser visto na figura 10, onde os mapas de epitopos de anticorpos direcionados contra o domínio I, I/II ou III de ECD de EGFR estão ilustrados.

[000285] Depois do achado de que as combinações de matrizes de 992, 1030 & 1024/1042 não resultavam em competição de anticorpo significativa como determinado por SPR, novos experimentos Biacore foram realizados para examinar quantos anticorpos poderiam se ligar simultaneamente ao antígeno receptor. Foi investigado primeiro qual o impacto que a saturação do Domínio III com os três anticorpos 992, 1024 e 1030 teve sobre a ligação de anticorpos direcionados contra outras especificidades de EGFR que não eram do domínio III. O resultado dessa análise é mostrado na figura 11A. As inibições de anticorpos únicos foram estabelecidas testando-os em combinações tanto com anticorpos isolados quanto com misturas de anticorpo de até três anticorpos geradas pela adição sequencial de um anticorpo extra durante cada ciclo de Biacore. Para assegurar o bloqueio completo do epítopo reconhecido, os anticorpos foram testados em concentrações individuais de 40 µg/mL. Como mostrado na figura 11A, os três anticorpos para o domínio III, 992, 1024 e 1030, foram encontrados se ligar simultaneamente ao receptor sem qualquer inibição da ligação. Os valores negativos de inibição observados aumentaram para cada anticorpo adicionado, sugerindo adicionalmente uma sinergia na ligação para o próximo anticorpo adicionado. Importante: uma vez que o domínio III foi incubado com os três anticorpos, outros anticorpos direcionados contra epítopos não

superpostos sobre o domínio I/II (mAb 1261), domínio I (1347) ou uma especificidade desconhecida (1361) pareceram estar se ligando sem bloqueio do epítopo a partir da mistura dos três mAb. Adicionalmente, esses anticorpos testados tiveram pequenos valores de inibição negativa indicando que eles estavam se ligando melhor depois da saturação com a mistura de três mAb. Consequentemente, esse experimento sugeriu que os seis anticorpos testados poderiam se ligar ao ECD de EGFR simultaneamente. Para testar adicionalmente esse fenômeno observado, uma mistura de anticorpo que consiste em todos os anticorpos testados (1261, 1347, 992, 1024, 1030 e 1361) foi feita e testada quanto à inibição de cada amostra de anticorpo individual na mistura. As misturas de anticorpo, onde o anticorpo da amostra testada não tinha sido incluído, também foram testadas para servir como um controle positivo. Como apresentada na *figura 11B/C*, todos os seis anticorpos testados foram verificados serem inibidos entre 80 a 116% quando testados para a ligação ao receptor de EGF incubado com a mistura completa de anticorpos. Entretanto, quando amostras individuais de anticorpo foram removidas dessa mistura, nenhuma inibição significativa da amostra de anticorpo em particular foi observada, ilustrando que os anticorpos na mistura eram bloqueados quanto à ligação ao receptor de EGF apenas por eles mesmos. Esse experimento ilustra claramente que pelo menos seis anticorpos que reconhecem epítópos não superpostos podem se ligar a EGFR simultaneamente. Como um experimento final, foi investigado se outros anticorpos direcionados contra o domínio I (1284), I/II (1257) ou cluster de especificidade desconhecida (1183, 1255) poderiam se ligar a EGFR, quando isso foi incubado com a mistura de seis anticorpos. Como apresentado na figura 11D, nenhum dos anticorpos testados foram capazes de se ligar significativamente a EGFR depois da incubação prévia com a mistura de seis anticorpos. Isso pode ser por

que a coleção de anticorpos não inclui anticorpos contra qualquer um dos sítios deixados desocupados pelos seis anticorpos ligados. Alternativamente, é possível que de fato todos os sítios sobre os domínios testados estivessem bloqueados com o anticorpo.

*Tabela 6 Anticorpos comercialmente disponíveis com especificidades documentadas contra domínios extracelulares de EGFR*

Clone	Espécie	Domínio I	Domínio II	Domínio III
ICR10	Rato	X		
199,12 / Ab11	Camundongo	X		
EGFR.1 / Ab3	Camundongo		X	
H11 / Ab5	Camundongo			X
111,6 / Ab10	Camundongo			X
528 / Ab-1	Camundongo			X
225 / Ab-2	Camundongo			X

Exemplo 4: Inibição da ativação de EGFR

*Determinação do bloqueio mediado por anticorpo da ligação do ligante EGF ao receptor EGFR por ELISA competitivo*

[000286] Para verificar que os anticorpos anti-EGFR testados se ligam ao receptor EGFR e simultaneamente bloqueiam a ligação do ligante EGF biotinilado, poços de ELISA foram revestidos com 80 µL/poço de EGFR de extensão completa em uma concentração de 0,5 µg/mL em PBS por uma noite a 4°C. Na manhã seguinte, os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados por uma hora com 150 µL de PBS-T-BSA 1% em temperatura ambiente, seguido pela lavagem duas vezes em PBS-T. Depois, 80 µL de anticorpos anti-EGFR diluídos em série e anticorpos de controle foram adicionados aos poços e incubados por 30 min em temperatura ambiente. Depois da incubação do anticorpo, 20 µL de ligante EGF biotinilado em uma concentração de 0,5 µg/mL foram adicionados a todos os poços contendo diluições de anticorpo anti-EGFR ou a poços contendo apenas PBS-T-BSA 1% e incubados em temperatura ambiente por 1

hora. Subsequentemente, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T, seguido pela incubação com 100 µL/poço de reagente secundário Estreptavidina-HRP diluído 1:1000 em tampão de bloqueio e incubação em temperatura ambiente por 30 min Finalmente, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e as placas foram desenvolvidas pela adição de 100 µL/poço de substrato TMB e incubadas por 60 min Depois da incubação, a reação foi paralisada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, 100 µL/poço e as placas foram lidas em OD 450 nm.

Reagentes de ELISA:

- 1) Tampão de revestimento: 1 x PBS; Gibco cat:20012-019
- 2) Antígenos: EGFR de tipo selvagem de extensão completa purificado de células A431; Sigma E2645
- 3) Placa de ELISA: NUNC Maxisorp; cat: 442404
- 4) Tampão de bloqueio/diluição: BSA 1% em PBS-T (PBS-T-BSA 1%)
- 5) Tampão de lavagem: 1 x PBS/Tween 20 0,05% (PBS-T)
- 6) Controle positivo: Erbitux, Vectibix
- 7) Controle negativo: Synagis (Medimmune Inc. Palivizumab, cat # NDC 60574-4111-1)
- 8) Ligante de EGF biotinilado; Invitrogen, cat. E3477
- 9) Estreptavidina-HRP, ultra-sensível: Sigma S 2438
- 10) TMB Plus; KemEnTec, cat# 4390L
- 11) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M

[000287] Os ensaios ELISA de competição foram empregados para classificar a habilidade dos anticorpos anti-EGFR de inibir a ligação do ligante EGF biotinilado ao receptor EGFR de extensão completa revestido para poços de ELISA. Como apresentado na *figura* 12, ambos, Erbitux e Vectibix, pareceram bloquear com muita potencia a ligação do ligante EGF enquanto que o anticorpo de controle negativo

Synagis, que não é direcionado contra EGFR, não inibiu a ligação do ligante EGF. Como mostrado na figura 12A, os três anticorpos 992, 1030 e 1042 direcionados contra o domínio III e que reconhecem epítopos não superpostos foram testados sozinhos ou em uma mistura equimolar, quanto as suas habilidades em inibir a ligação do ligante EGF. Dos três anticorpos testados, apenas o mAb 1030 mostrou uma modesta atividade inibitória do ligante EGF quando comparado com Erbitux e Vectibix. A mistura equimolar de mAbs 992, 1030 e 1042 pareceu ser mais eficiente na inibição do ligante EGF do que os anticorpos isolados testados sozinhos. Em uma concentração total de IgG de 1 µg/mL, a mistura equimolar foi encontrada inibir a ligação do ligante EGF aproximadamente duas vezes mais eficientemente do que o mAb 1030 e quatro vezes mais eficientemente do que os mAbs 992 e 1042 testados sozinhos, mostrando um efeito sinérgico da mistura dos três anticorpos para do domínio III que reconhecem epítopos não superpostos. Como mostrado na figura 12B, os clones 1208, 1260, 1277 e 1320 anti-EGFR também foram testados nesse ensaio. Esses quatro clones foram capazes de inibir a ligação do ligante de EGF de uma maneira dependente da dose, que foi mais eficiente do que a observada com os clones 992, 1030 e 1042 quando comparados com o controle Erbitux. Nas concentrações acima de 0,33 µg/mL, os clones 1208, 1260, 1277 e 1320 pareceram ser tão eficientes em bloquear a ligação do ligante de EGF quanto Erbitux testado nas mesmas concentrações.

*Habilidade para inibir a fosforilação de EGFR induzida por EGF em células HN5*

[000288] Anticorpos anti-EGFR foram testados quanto à reatividade sobre a fosforilação de EGFR em uma análise western em célula. O procedimento western em célula possibilita a detecção de EGFR e de EGFR fosforilado (pEGFR) da mesma amostra, isso por sua vez torna

possível comparar a proporção da expressão de EGFR para pEGFR para cada tratamento com anticorpo e conjunto de dados. As células HN5 foram cultivadas de acordo com as instruções fornecidas pela ATCC em DMEM suplementado com FCS 10% e penicilina/estreptomicina. 43.000 células HN5 foram semeadas em placas de 96 poços da Nunc (no. Cat. 167008) 24 h antes da morte por privação. As células foram mortas em DMEM 16 h antes da adição dos anticorpos. Os anticorpos foram adicionados em uma concentração final de 10 µg/mL em 200 µL de DMEM e a mistura foi pipetada para cima e para baixo pelo menos cinco vezes para misturar. Depois de 30 min de tratamento do anticorpo, EGF foi adicionada em uma concentração de 50 µg/mL a poços apropriados e deixados por 7,5 min. Westerns em célula foram realizados essencialmente com as instruções fornecidas pelo fabricante do kit de western em célula (Odyssey, LI-COR biosciences).

[000289] As células foram fixadas em formaldeído 3,7% (Sigma F-8775, lote 71K500, contendo ~ 1% de metanol) por 20 min depois da estimulação de EGF. Cinco lavagens com PBS-Triton X-100 (0,1%) por 5 min foram usadas a fim de permeabilizar as membranas celulares antes do bloqueio no tampão de bloqueio LI-COR (927-40000). Os anticorpos primários foram adicionados em concentrações que correspondem às instruções fornecidas e incubados com agitação cuidadosa em RT por 2,5 h (EGFR total de camundongo, diluição 1:500, Biosource International no. Cat. AHR5062 e Fosfo-EGFR Tyr1173, Coelho diluição 1:100, Biosource, no. Cat. 44-794G).

[000290] Depois da incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas cinco vezes por cinco minutos em PBS-T (Tween-20 0,1%) depois do que os anticorpos secundários foram adicionados (IRDye 680 de cabra anticoelho, diluição 1:200, LI-COR no. Cat. 926-32221 e IRDye 800CW de cabra anticamundongo,

diluição 1:800; LI-COR no. Cat. 926-32210) e incubados por 1 h em RT com agitação cuidadosa da placa coberta com folha de alumínio.

[000291] Antes da medição com o leito de fluorescência Tecan, a placa foi lavada cinco vezes por cinco min em PBS-T. Todas as lavagens foram finalizadas por um movimento de deslocamento abruptamente abortado das placas, lado aberto para baixo, para dispersar a solução de lavagem, seguido pela batida da placa contra toalhas de papel. (Idêntico ao tratamento de placas de ELISA, a coisa mais importante é a noção de que as células permaneçam na placa durante esse tratamento e que a solução de lavagem possa ser removida por esse procedimento mais do que pela sucção, que perturbaria a integridade da monocamada de células). Qualquer resíduo da solução de lavagem deixado pela última lavagem foi removido com sucção cuidadosa no lado dos poços com uma pipeta de multi-canais. O sinal fluorescente foi medido pelo canal de 680 nm (excitação a 675 nm e emissão a 705 nm, ambas com largura de banda de 10 nm) e pelo canal de 800 nm (excitação a 762 nm e emissão a 798 nm, ambas com largura de banda de 10 nm).

[000292] Usando a análise Western em célula, torna-se evidente que os três anticorpos estão significativamente ( $p<0,05$ ) afetando o status de pEGFR das células HN5: os anticorpos 1208, 1277 e 1320 (*figura 13*).

[000293] A mistura anti-EGFR (992, 1030 e 1042) de anticorpos anti-EGFR e os anticorpos individuais dessa foram testados quanto ao efeito em uma análise western em célula da inibição da fosforilação de EGFR induzida por EGF. Como visto na *figura 14*, 992 e 1030 e a mistura de anticorpo anti-EGFR inibiu significativamente a fosforilação de EGFR induzida por EGF ( $p<0,05$ ).

**Exemplo 5:** Internalização de Receptores de EGF em células A431NS

[000294] Células A431NS (ATCC# CRL-2592) foram tripsinizadas a

partir de um frasco de cultura T175 80-90% confluente usando TrypLE. As células separadas foram lavadas em PBS e suspensas em DMEM sem soro. As células foram divididas em porções de 1-2 mL e incubadas por 30 min sobre gelo com os anticorpos examinados. A concentração de anticorpo era de 10 µg/mL. As células foram lavadas três vezes em DMEM (250g, 4 min, 4°C) e ressuspensas em 1m8 mL de DMEM. Cada porção foi dividida em seis tubos de FACS contendo cada um 300 µL de suspensão de célula. Três tubos de cada porção são colocados em um banho de água a 37°C em exatos 40 min e os outros três são colocados sobre gelo imediatamente. Depois da incubação, as células foram lavadas duas vezes (250g, 4 min, 4°C) e os péletes redissolvidos em 100 µL de Fcγ de F(ab')<sub>2</sub> de coelho anti-IgG humana – FITC em DMEM. As células são incubadas por 30 min a 4°C antes de lavadas três vezes em DMEM 4°C e analisadas em FACSCalibur.

[000295] Os resultados são mostrados na *figura 15*. A incubação com Erbitux e Vectibix mostrou um nível igual de internalização de receptor de cerca de 30%, deixando 70% da superfície inicial corada. A incubação com 992 sozinho leva a regulação negativa de 45% do receptor. A incubação com misturas de anticorpo contendo dois anticorpos adicionais com epítopos não superpostos leva a um aumento da regulação negativa do receptor: 992 + 1024, 74%; 992 + 1024 + 1030, 83%.

[000296] A adição de anticorpos adicionais não leva a um aumento adicional na internalização do receptor. Portanto, pelo menos três anticorpos parecem ser necessários para alcançar o nível máximo de internalização em células A431.

#### Exemplo 6: Ensaios de proliferação

[000297] O dano celular resultará inevitavelmente na perda da habilidade da célula em manter e fornecer energia para a função

celular metabólica e de crescimento. Os ensaios de atividade metabólica são baseados nessa premissa. Geralmente, eles medem a atividade mitocondrial. O Reagente de Proliferação Celular WST-1 (Roche, Cat. No. 11 644 807 001) é um substrato pronto para uso que mede a atividade metabólica de células viáveis. Portanto, é presumido que a atividade metabólica se correlacione com o número de células viáveis. Nesse exemplo, o ensaio com WST-1 foi usado para medir o número de células metabolicamente ativas depois do tratamento com diferentes anticorpos em diferentes concentrações.

[000298] Antes de realizar o ensaio WST-1, os anticorpos e misturas de anticorpos apropriados foram diluídos até uma concentração final total de anticorpo de 20 µg/mL em DMEM suplementado com FBS 0,5% e P/S 1%, fornecendo uma concentração final de anticorpo de 10 µg/mL no poço com a concentração mais alta de anticorpo. 150 µL dessas soluções foram adicionadas a poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e uma diluição em série de três vezes foi feita até a coluna 9 tal que cada poço continha 100 µL de solução de anticorpo. 100 µL de meio foram adicionados à coluna 11. 200 µL de meio foram adicionados às Fileiras 1 e 8, assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito de evaporação do meio nos poços experimentais.

[000299] As células A431-NS foram lavadas com 1 x PBS e separadas pela tripsinização com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de meio completo foram então adicionados e as células centrifugadas a 300 xg (1200 rcf) por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em DMEM + FBS 0,5%. As células foram contadas e suas concentrações ajustadas para 15.000 células/mL. 100 µL da suspensão de célula (1500 células/poço) foram então adicionadas aos poços experimentais nas colunas 2-11. As placas foram incubadas por 4 dias em uma incubadora umidificada a 37°C. Depois, 20 µL de reagente WST-1 foi adicionado por poço e as placas

foram incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram transferidas para um agitador orbital de placas e deixadas por mais uma hora. A absorbância foi medida a 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em um leitor de ELISA. A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como um percentual dos controles não tratados, como se segue:

$$\%MAC = \left( 1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

[000300] Para os estudos de titulação de EGF, o ligante foi diluído até uma concentração de 20 nM/mL em DMEM + FBS 0,5%, fornecendo uma concentração final de anticorpo de 10 nM/mL no poço com a concentração mais alta de EGF. 150 µL dessa solução foi adicionada a poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e uma diluição em série de três vezes foi feita até a coluna 9 tal que cada poço continha 100 µL de solução de EGF. 100 µL de meio foram adicionados à coluna 11. 200 µL de meio foram adicionados às Fileiras 1 e 8, assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito de evaporação do meio nos poços experimentais. Os anticorpos apropriados e as misturas de anticorpo foram diluídos até uma concentração final total de anticorpo de 40 µg/mL em DMEM suplementado com FBS 0,5% e P/S 1%, fornecendo uma concentração final de anticorpo de 10 µg/mL nos poços. 50 µL dessas soluções foram então adicionadas aos poços das colunas 2-9 da placa de 96 poços.

[000301] As células A431-NS foram então lavadas com 1 x PBS e separadas pela tripsinização com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de meio completo foram então adicionados e as células centrifugadas a 300 xg (1200 rcf) por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em DMEM + FBS 0,5%. As células foram contadas e suas concentrações ajustadas para 40.000 células/mL. 50

$\mu\text{L}$  da suspensão de célula (2000 células/poço) foram então adicionadas aos poços experimentais nas colunas 2-11. As placas foram incubadas por 4 dias em uma incubadora umidificada a 37°C. Depois, 20  $\mu\text{L}$  de reagente WST-1 foram adicionados por poço e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram então transferidas para um agitador orbital de placas e deixadas por mais uma hora. A absorbância foi medida a 450 e 620 nm (comprimento de onda de *referência*) em um leitor de ELISA. As quantidades de células metabolicamente ativas são indicadas pela absorbância a 450 nm subtraída da absorbância no comprimento de onda de *referência* de 620 nm.

[000302] A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como um percentual dos controles não tratados, como se segue:

$$\%MAC = \left( 1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

## Resultados

[000303] Para mostrar que a mistura de três anticorpos anti-EGFR com epítopos não superpostos dentro do domínio III é superior aos anticorpos sozinhos, um experimento foi realizado que investigou a inibição do crescimento de A431-NS. Como pode ser visto na *figura* 16A, os anticorpos são inibidores insignificantes do crescimento de A431-NS por si mesmos, mas quando combinados, um efeito inibitório sinérgico sobre o crescimento de 431-NS é obtido. Embora misturas de 992 tanto com 1042 quanto com 1030 também sejam muito potentes, a mistura de todos os três é superior a essas em todas as faixas de concentração de anticorpo.

[000304] Os efeitos de anticorpos individuais e misturas de anticorpo sobre o crescimento de células A431-NS estimuladas com concentrações variáveis de EGF foram investigados e os resultados

são mostrados na *figura 17*. Como pode ser visto na figura 17, as concentrações de EGF acima de 0,1 nM na ausência de anticorpos são tóxicas para as células. Entretanto, é evidente que uma mistura de três anticorpos com epítopos não superpostos dentro do domínio III de EGFR (992, 1030 e 1042) atua sinergicamente para inibir o crescimento das células A431-NS na presença de EGF, quando testada até pelo menos 0,3 nM de EGF e a mistura é superior a todos os anticorpos monoclonais.

[000305] É demonstrado que o efeito inibitório sinérgico sobre o crescimento de A431-NS também pode ser obtido pela combinação de dois anticorpos com epítopos não superpostos dentro do domínio III de EGFR, com anticorpos com epítopos dentro do domínio I ou II de EGFR. Como pode ser visto na *figura 18*, combinações do anticorpo 992 e 1024 que estão ambos no domínio III de EGFR, com qualquer um anticorpo reativo com o domínio I (1284) ou com o domínio II (1434) de EGFR são tão potentes quanto os três anticorpos que reagem com epítopos não superpostos dentro do domínio III de EGFR (992+1024+1030). Adicionalmente, essas misturas de anticorpos são mais potentes em inibir o crescimento de A431-NS do que os anticorpos terapêuticos anti-EGFR Erbitux e Vectibix.

[000306] Ensaio similares foram realizados usando outras duas linhagens celulares de câncer, DU145 (ATCC#HTB-81) e MDA-MB-468 (ATCC#HTB-132). Os resultados desses ensaios de proliferação são mostrados nas *figuras 16B* e *16C*. Em ambos os casos, uma mistura de três anticorpos (992, 1030 e 0142) foi superior a misturas de dois anticorpos ou a anticorpos isolados. Nas células DU145, a mistura de três anticorpos foi superior a Vectibix em todas as concentrações e em MDA-MB-468 em altas concentrações.

[000307] Usando um método similar aquele descrito acima, nós testamos diferentes combinações de três anticorpos anti-EGFR.

## Resultados

[000308] Os efeitos de combinações diferentes de três anticorpos foram investigados na linhagem celular A431-NS. A atividade inibitória do crescimento de vinte dos mais potentes desses é mostrada na figura 37. Todas as combinações inibiram a proliferação da linhagem celular A431-NS em mais do que 60% comparada com um controle não tratado. Outra observação interessante é que, com exceção das combinações (992+1024+1254 e 992+1024+1320 e 992+1277+1320), as combinações contêm epítopos não superpostos. Isso mostra que é possível planejar várias combinações de três anticorpos que se liguem a epítopos distintos.

## Exemplo 7: Apoptose

[000309] A apoptose é um mecanismo biológico que leva à morte da célula. Esse mecanismo foi relatado anteriormente com o uso de anticorpos anti-EGFR, tais como Erbitux (Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy – focus on cetuximab. Eur J Cancer. 2001 Sep;37, Suppl 4:S16-22). Portanto, foi investigado em qual extensão os anticorpos individuais anti-EGFR 992, 1042 e 1030 assim como a mistura (992+1030+1042) eram capazes de induzir a apoptose.

[000310]  $1 \times 10^4$  células A431-NS foram incubadas em DMEM suplementado com 0,5% de FBS e antibióticos em determinações triplas em placas de cultura de 96 poços na presença da mistura para EGFR (partes iguais de 992, 1030, 1042), 992, 1030, 1042, Erbitux ou Vectibix, em concentrações que variavam entre 0,01 µg/mL a 10 µg/mL. As células e os anticorpos foram incubados por 22 h. Depois, os sobrenadantes foram coletados e medidos em um kit de ELISA da Roche, No. Cat. 11774425001 (Basiléia, Suiça), quanto à presença de complexos de histona-DNA.

[000311] O efeito da mistura foi comparado com cada um dos anticorpos monoclonais sozinhos, assim como com os anticorpos de

*referência Vectibix e Erbitux usando células A431-NS (resultados na figura 19).* Os anticorpos foram testados em uma diluição de 10 vezes. A mistura é significativamente ( $P<0,05$ ) mais eficiente comparada com os anticorpos monoclonais individuais assim como Vectibix quando testado em concentrações de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A mistura aumentou a apoptose estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) comparada com Erbitux 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### Exemplo 7b

[000312] Em adição ao exemplo 7, a mistura de 992+1024 assim com a mistura de 992+1024+1030 foram investigadas quanto à atividade apoptótica de acordo com o mesmo método como descrito no exemplo 7 (figura 35). O nível real de apoptose foi relacionado com um controle positivo máximo. Ambas as misturas foram comparadas com Erbitux e os anticorpos monoclonais individuais 992, 1024 e 1030, assim como um anticorpo de controle, em 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  usando as células A431-NS. A mistura de 992+1024 foi significativamente melhor do que Erbitux e os anticorpos individuais (todos com  $P<0,05$ ).

#### Exemplo 8: Eficácia *in vivo*

[000313] A mistura anti-EGFR que consiste em anticorpos 992, 1030 e 1042 foi investigada quanto à eficácia *in vivo* no modelo de xeno-enxerto em camundongos nus usando células A431-NS. Esse é um modelo amplamente usado para a investigação da potencia de anticorpos monoclonais anticancer, incluindo anticorpos anti-EGFR. Os camundongos nus são imuno-comprometidos e carecem de células T. Isso permite o crescimento de células humanas nos camundongos.

[000314] Dois grupos de camundongos nus com 6 a 8 semanas foram inoculados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  células A431-NS. Quando o tamanho médio do tumor atingiu  $100 \text{ mm}^3$ , o tratamento foi iniciado. Os camundongos receberam cinco injeções de 1 mg de anticorpo, por via intraperitoneal com intervalos de 2 a 3 dias. Os

tamanhos dos tumores foram medidos em dois diâmetros usando calibradores digitais e o volume foi calculado usando a fórmula: Volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) =  $L \times W^2 \times 0,5$ , onde L é o diâmetro mais comprido e W é o diâmetro mais curto (Teicher BA, Tumor Models in Cancer Research. Humana Press, NJ, USA 2002, p596). No final do experimento, os tumores foram removidos e pesados.

[000315] Synagys foi usado como anticorpo de controle. O experimento também incluiu o tratamento com Erbitux e Vectibix na mesma quantidade e usando o mesmo esquema como para a mistura anti-EGFR (anticorpos 992, 1030 e 1024).

[000316] Como visto na figura 20, a mistura de 992, 1030 e 1024 inibiu significativamente o crescimento do tumor de A431-NS ( $P<0,05$ ). Os pesos médios estão mostrados na figura 21. O resultado correlacionou-se com os tamanhos medidos dos tumores. Há uma diferença significativa entre o grupo de tratamento e o grupo de controle.

#### Exemplo 8b: Eficácia *in vivo*

[000317] Adicionalmente ao experimento *in vivo* descrito no exemplo 8, as misturas de 992+1024 e 992+1024+1030 foram investigadas no modelo de xeno-enxerto de A431-NS acima descrito (figura 36). Quatro grupos cada um com 9 camundongos nus, de 6 a 8 semanas, foram inoculados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  células A431-NS. Quando o tamanho médio do tumor atingiu  $100 \text{ mm}^3$ , os camundongos receberam a primeira injeção de anticorpo. Os três grupos receberam igualmente a mistura de 992+1024, 992+1024+1030, Erbitux ou anticorpo de controle, Synagis. No total, os camundongos receberam 17 injeções de 0,5 mg 4 vezes por semana. A primeira injeção foi dada no dia 8 e a última injeção foi dada no dia 34. Os tamanhos dos tumores foram medidos por 56 dias. Depois do término do tratamento com anticorpo, os tumores dos camundongos que receberam Erbitux

começaram aumentar de tamanho, enquanto que os tumores continuaram a diminuir de tamanho nos camundongos nos dois grupos que receberam a mistura de 992+1024 ou 992+1024+1030. Nenhuma expansão no tamanho do tumor foi observada no grupo com 992+1024 no dia 91 (57 dias depois do término do tratamento). O tamanho médio do tumor para a combinação de 992+1024 era significativamente menor ( $P<0,01$ ) no dia 56 do que o tamanho médio do tumor nos camundongos que receberam Erbitux.

[000318] A sobrevida dos camundongos no experimento também foi monitorizada. Os camundongos foram classificados como mortos quando os tumores alcançavam os tamanhos máximos permitidos. A tabela abaixo mostra o número de camundongos sobreviventes 56 dias depois da inoculação das células do tumor. Uma sobrevida melhorada é vista em ambas as combinações comparadas com Erbitux.

Grupo	992+1024	992+1024+1030	Erbitux	Ab de Controle
Número inicial de camundongos	9	9	9	9
Camundongos remanescentes no dia 56	9	9	2	0

### **Experimentos adicionais**

[000319] Os dados preliminares de lisados do tumor do experimento com xeno-enxerto descrito no exemplo 8 mostraram que a combinação de 992+1024+1030 induz uma potente regulação negativa da produção de VEGF por A431-NS, o primeiro sendo um importante mediador da angiogênese. A formação aumentada de vasos sanguíneos é um fenômeno visto em vários tumores sólidos, um mecanismo que participa do suprimento sustentado de nutrientes, etc., afetando dessa maneira as condições de sobrevida.

[000320] Adicionalmente, outros dados preliminares mostram que um

nível aumentado da combinação de anticorpos 992+1024+1030 pode ser observado nos lisados de tumor do experimento com xeno-enxerto descrito no exemplo 8, quando comparado com Erbitux e Vectibix.

Exemplo 8c: Diferenciação intensificada de célula de tumor *in vivo*

[000321] A diferenciação terminal de células é um processo complexo que inclui a ativação de programas de expressão de gene específicos para o tipo celular. Levando a um processo de múltiplas etapas até uma perda irreversível de sua capacidade proliferativa. Na doença maligna, as células cancerosas estão geralmente em um estado desdiferenciado, caracterizado por uma taxa de proliferação aumentada e tem sido sugerido que fármacos capazes de induzir a diferenciação terminal de células de câncer poderiam ser capazes de eliminar as células malignas e restabelecer a homeostase celular normal (Pierce GB, Speers WC: Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. Cancer Res 48:1996-2004, 1988). Sob certas condições experimentais, os anticorpos monoclonais anti-EGFR foram descritos previamente como capazes de aumentar a taxa de diferenciação terminal de células escamosas de câncer humano, desenvolvidas como tumores xeno-enxertados em camundongos imuno-comprometidos (Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z: *In vivo* enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. Clin Cancer Res 6:701-8, 2000; Modjtahedi H, Eccles S, Sandle J, Box G, Titley J, Dean C: Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas with antibodies to the epidermal growth factor receptor. Cancer Res 54:1695-701, 1994).

[000322] Foi examinado histologicamente a extensão da diferenciação terminal em células A431-NS tratadas com anti-EGFR como xeno-enxertos em camundongos. O estudo histológico incluiu 3

tumores xeno-enxertados de camundongo aleatoriamente selecionados de cada um dos quatro grupos experimentais do experimento descrito no exemplo 8.

[000323] Os tecidos foram dissecados e rapidamente congelados, montados depois com Tissue-Tek em um criomicrótomo (Leitz, modelo 1720), cortados em seções de 5  $\mu$  e amostrados em lâminas superfrost plus, processados depois para coloração com hematoxilina/eosina. Dois observadores independentes realizaram o exame microscópico de todas as seções de tecido de uma maneira cega, pontuando as áreas queratinizadas (“pérolas de queratina”) como uma medida da extensão da diferenciação terminal (Modjtahedi *Et al.*, 1994). A tabela 7 relaciona o resultado obtido. Os camundongos tratados com uma mistura de três anticorpos anti-EGFR (992+1024+ 1030, grupo 1) tiveram focos acentuadamente maiores e mais numerosos de células de câncer terminalmente diferenciadas quando comparados com os camundongos tratados com os anticorpos de *referência* Erbitux e Vectibix (Grupos 2 e 3, respectivamente). Nenhuma diferenciação terminal foi detectada no grupo de controle que recebeu PBS ao invés do anticorpo (grupo 4).

[000324] As imagens microscópicas representativas foram obtidas usando um microscópio acoplado a uma câmera digital, veja figura 26.

[000325] Em conclusão, a combinação de três anticorpos anti-EGFR com epítopos não superpostos dentro do domínio III (clones 992, 1030 e 1042) mostrou um efeito de indução da diferenciação inesperadamente intensificado sobre células de tumor *in vivo*, quando comparada com os anticorpos monoclonais Erbitux e Vectibix. Os efeitos observados sobre a diferenciação terminal levam a conclusão de que as composições de anticorpo da invenção podem ser usadas em terapia de combinação com outros agentes que induzem a diferenciação, tais como ácido retinoico, 4-fenil butirato.

**Tabela 7**

Grupo	Tumor No.	Pontuação do No. De pérolas de queratina	Comentários
1	16	++++	Grandes pérolas de queratina
1	17	+++	Grandes pérolas de queratina
1	54	++++	Grandes pérolas de queratina
2	14	++	Pequenas pérolas de queratina
2	45	++	Pequenas pérolas de queratina
2	49	++	Pequenas pérolas de queratina
3	11	++	Pequenas pérolas de queratina
3	34	++	Pequenas pérolas de queratina
3	56	++	Pequenas pérolas de queratina
4	43	-	
4	60	-	
4	31	-	

Exemplo 8d: Efeito inibitório sustentado do crescimento de uma composição de anticorpo da invenção

[000326] Uma repetição do experimento de xeno-enxerto de tumor apresentado nos exemplos 8 e 8b foi realizada para investigar a eficácia *in vivo* da mistura de anticorpos 992+1024. Em resumo, camundongos BALB/C *nu/nu* foram inoculados por via subcutânea com  $10^6$  células A431-NS no flanco. Os xeno-enxertos de tumor foram deixados crescer até um tamanho médio do tumor de  $100 \text{ mm}^3$  (dia 7), em cujo ponto os camundongos foram divididos em cinco grupos de nove animais e os tratamentos com anticorpo foram iniciados. Os cinco grupos receberam dose alta (2 mg/semana) ou baixa (1 mg/semana) da mistura de 992+1024 ou do anticorpo de referência Erbitux ou uma dose alta (2 mg/semana) do anticorpo de controle Synagis. Todos os camundongos receberam um total de 9 injeções de 0,5 ou 1 mg de anticorpo duas vezes por semana começando no dia 7 e terminando no dia 33.

[000327] A dose alta (2 mg/semana) da mistura de 992+1024 foi

mais eficiente no controle do crescimento inicial do tumor e na indução a longo prazo da regressão do tumor quando comparada com Erbitux ( $P=0,0002$ , figura 38). Nenhum dos animais que recebeu 2 mg/semana da mistura de 992+1024 foi excluído no período do estudo (118 dias depois do início do experimento, figura 38 e 39), um desempenho significativamente melhor do que no grupo com alta dose de Erbitux 2mg/semana onde apenas um dos nove animais restou o dia 60 ( $P=0,0008$ , figura 39). Isso mostra o efeito sustentado do tratamento com 992+1024 na sobrevida a longo prazo. Embora menos eficiente do que a alta dose, a dose baixa da mistura de 992+1024 (1 mg/semana) também foi capaz de controlar o crescimento do tumor e foi significativamente melhor comparada com a alta dose de Erbitux 2 mg/sem, quando se olha para ambas, a supressão do tumor ( $P=0,0135$ , figura 38) e sobrevida ( $P= 0,0087$ , figura 39). Esses resultados demonstram a potencia superior da combinação de 992+1024 quando comparada com Erbitux mesmo em dose baixa. Os resultados também demonstram a inibição sustentada do crescimento induzida pela combinação de 992+1024 comparada com um anticorpo monoclonal aprovado.

Exemplo 9: Crescimento de esferoide

[000328] Para o estudo de esferoide, a uma placa de 96 poços de fundo arredondado foram adicionados 35  $\mu\text{L}$  de uma solução de 120 mg/mL de Poly-HEMA e deixado evaporar durante uma noite em uma capela de fluxo. Poly-HEMA evita o acoplamento das células. As células A431-NS foram tratadas como acima, contadas e sua concentração ajustada para 100.000 células/mL. 50  $\mu\text{L}$  da suspensão celular (5.000 células/poço) foram adicionados aos poços experimentais nas colunas 2-11 junto com 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de matrizel 5%. 200  $\mu\text{L}$  de meio foram adicionados às Fileiras 1 e 8 assim como á coluna 1 e 12 para diminuir o efeito de evaporação do meio

nos poços experimentais. As placas foram centrifugadas a 300 xg por 5 minutos e deixadas se organizar por uma noite em uma incubadora umidificada a 37°C. No dia seguinte, os anticorpos e misturas de anticorpos apropriados foram diluídos para uma concentração final total de 20 µg/mL em uma placa de 96 poços vazia. Isso foi feito em DMEM suplementado com FBS 0,5% e P/S 1% fornecendo uma concentração final de anticorpo de 10 µg/mL no poço com a concentração de anticorpo mais alta. 150 µL dessas soluções foram então adicionadas aos poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e uma diluição seriada de três vezes foi feita até a coluna 9 tal que cada poço continha 100 µL de solução de anticorpo. 100 µL de meio foram adicionados à coluna 11. 100 µL dessas soluções foram transferidas para a placa que continha os esferoides e deixada incubar por 7 dias. Depois, 20 µL de reagente WST-1 foram adicionados por poço e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. As placas são então transferidas para um agitador orbital de placas e deixadas por mais uma hora. A absorbância foi medida a 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em um leitor de ELISA. A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como um percentual dos controles não tratados, como se segue:

$$\%MAC = \left( 1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

[000329] Uma mistura de três anticorpos com epítopos não superpostos dentro do domínio III (992+1030+1024) inibe eficazmente o crescimento de esferoides de A431-NS e é mais potente do que o anticorpo monoclonal terapêutico anti-EGFR Erbitux e Vectibix (*figura 22*).

#### Exemplo 10: Ligação a ECD de EGFR de Cynomolgus

*Clonagem do domínio extracelular de EGFR de Cynomolgus*

[000330] O domínio extracelular de EGFR de Cynomolgus, excluindo o peptídeo de sinal, foi clonado a partir do cDNA de Cynomolgus isolado da epiderme pelo uso de nested PCR e iniciadores específicos para a sequência derivados da sequência publicada de EGFR humano de extensão completa (GENBANK X00588, Ullrich, A. *Et al.* Nature 309(5967), 418-425 (1984)).

[000331] Reagentes de PCR:

cDNA de Macaco Cynomolgous isolado da epiderme da pele normal

CytoMol Unimed, Cat. No: ccy34218, Lote No: A711054.

Tampão de reação Phusion (5X): Finnzymes, Cat. no: F-518, Lot. No: 11.

Enzima Phusion: Finnzymes, F-530S (2 U/ $\mu$ L).

dNTP 25 mM: Bioline, Cat. No: BIO-39029, Lot. No: DM-103F.

[000332] Iniciadores para a amplificação de ECD de EGFR de Cynomolgus incluindo a sequência de sinal parcial e o domínio transmembrana:

Iniciador 5' ATG: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO 135)

Iniciador 3' Tm 2: 5'-TTCTCCACTGGCGTAAGAG-3' (SEQ ID NO 136)

[000333] Iniciadores para nested PCR que amplificam ECD Bp 1-1863 de EGFR de Cynomolgus e incorporam os sítios de restrição XbaI, MluI e códon de parada antes do domínio transmembrana:

5' EGFR XbaI: 5'-ATCTGCATTCTAGACTGGAGGAAAAGAAAGTTGCCAAGGC-3' (SEQ ID NO 137)

3' EGFR MluI: 5'-TACTCGATGACGCGTTAGGATGGATCTTAGGCCGTTCC-3' (SEQ ID NO 138)

Condições de PCR:

[000334] 30 ciclos: 98°C/30 seg fusão, 55°C/30 seg anelamento,

72°C/60 seg alongamento. Depois de 30 ciclos os produtos de PCR foram deixados alongar por 5 min adicionais.

[000335] As reações de PCR foram realizadas com 1 µL de modelo e 2 unidades de Phusion Enzyme em um volume total de 50 µL de tampão de reação contendo dNTP 0,2 mM, iniciador 0,5 µM.

[000336] Uma banda final de PCR com comprimento aparente de aproximadamente 1800-1900 pb foi obtida e clonada no vetor de expressão. A sequência de DNA e proteína do domínio extracelular clonado de EGFR de Cynomolgus é mostrada na figura 23 e a sequência de proteína de ECD de EGFR de Cynomolgus alinhada com ECD de EGFR humano é mostrada na figura 24. O alinhamento das sequências de DNA do ECD de EGFR humano e ECD de EGFR de Cynomolgus mostrou 97,6% de identidade de sequência, enquanto que o alinhamento das sequências de proteína correspondentes mostrou 98,6% de identidade de sequência.

*Demonstração da reatividade cruzada de anticorpo entre o domínio extracelular de EGFR Humano e de Cynomolgus em ELISA*

[000337] Para verificar que os anticorpos anti-EGFR testados se ligam igualmente bem a ambos ECD de EGFR de Humano e de Cynomolgus e, consequentemente, fundamentar os estudos toxicológicos em macacos Cynomolgus, diluições seriadas de quatro vezes de anticorpos começando a partir de 1 µg/mL foram testadas por ELISA quanto à ligação a proteínas de ECD de EGFR de Humano e de Cynomolgus. Os anticorpos que mostram perfis de ligação idênticos nesse ensaio foram tomados como indicação de boas espécies de EGFR com reatividade cruzada. Poços de ELISA foram revestidos com 50 µL/poço de EGFR de extensão completa em uma concentração de 1 µg/mL em PBS por uma noite a 4°C. Na manhã seguinte, os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados por uma hora com 100 µL de PBS-T-BSA 1% em

temperatura ambiente, seguida pela lavagem duas vezes em PBS-T. Depois, 50 µL de anticorpos anti-EGFR seriadamente diluídos e anticorpos de controle foram adicionados a poços e incubados por uma hora em temperatura ambiente. Depois da incubação do anticorpo, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T, seguido pela incubação com 50 µL/poço de reagente secundário Estreptavidina-HRP diluído 1:3000 em tampão de bloqueio e incubação em temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e as placas foram desenvolvidas pela adição de 50 µL/poço de substrato TMB e incubados em temperatura ambiente. Depois da incubação a reação foi extinta pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M; 100 µL/poço e as placas foram lidas em OD 450 nm.

#### Reagentes de ELISA

- 1) Placa de ELISA; NUNC Maxisorp; cat: 442404
- 2) Antígenos: ECD de rEGFR humano; ECD de rEGFR de Cynomolgus
- 3) Tampão de revestimento: 1 x PBS; Gibco cat:20012-019
- 4) Tampão de lavagem: 1 x PBS/Tween 20 0,05% (PBS-T)
- 5) Tampão de bloqueio/diluição: BSA 1% em PBS-T
- 6) Conjugado anti-IgG humana de cabra-HRP; Serotec, Star 106P
- 7) TMB Plus; KemEnTec, cat# 4390L
- 8) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M

[000338] Como mostrado na figura 25, o ensaio ELISA descrito pode discriminar entre anticorpos com reação cruzada anti-ECD de EGFR Humano e de Cynomolgus (figura 25A) e anticorpos específicos para a espécie que reconhecem apenas o ECD de EGFR humano usado para imunizações de camundongo (*figura 25B*).

#### Exemplo 11: Inibição da motilidade

[000339] A maioria das mortes por câncer deriva da disseminação de células do tumor e subsequente crescimento em localizações distantes. A invasão local do tecido normal adjacente compromete as funções homeostáticas e evitam a excisão cirúrgica ou radiológica do tumor. Investigações recentes destacaram o papel central que a motilidade induzida desempenha na promoção dessa disseminação. EGFR é conhecido por facilitar a motilidade celular e a disseminação e, portanto, a inibição da motilidade mediada por EGFR é um mecanismo importante de fármacos direcionados a EGFR.

[000340] O efeito da mistura dos dois anticorpos 992 e 1024 sobre a motilidade da linhagem celular de carcinoma de cabeça e pescoço foi investigada. Esferoides consistindo em 10.000 células foram preparados durante a noite como descrito no exemplo 9. Os esferoides foram transferidos para frascos de cultura de célula NUNC T25 e deixados aderir durante a noite. 10 µg/mL da mistura de anticorpos 992+1024 ou um anticorpo de controle negativo foram adicionados e os esferoides foram incubados por outras 24 horas. As imagens foram feitas em uma ampliação de 40x e a área coberta pelas células foi medida usando o programa Image J.

[000341] Resultados: Como pode ser visto na *figura 27A*, a adição dos anticorpos 992 e 1024 específicos para EGFR levou a uma diminuição significativa da área coberta pelas células do tumor. A motilidade é quantificada na *figura 27B*, que mostra que a motilidade está diminuída em aproximadamente 60% quando comparada com o anticorpo de controle negativo. Essa diminuição na motilidade é altamente significativa,  $p<0,01$ .

[000342] Portanto, a combinação dos anticorpos 992 e 1024 inibe potencialmente a motilidade da célula de tumor mediada por EGFR, o que indica que as combinações de anticorpos anti-EGFR podem ser usadas para o tratamento da doença disseminada.

Exemplo 12: Regulação positiva de Involucrina pela composição de anticorpo Sym004

[000343] A involucrina é um marcador de diferenciação precoce de célula escamosa e uma proteína que está envolvida na formação do envelope corneificado. Os níveis de involucrina podem, portanto serem usados como medida do número de células de tumor que estão diferenciadas. Os níveis de involucrina foram avaliados nos lisados de proteína de tumores xeno-enxertados de A431-NS tanto nos não tratados quanto nos tratados com Erbitux, Vectibix ou uma mistura dos anticorpos 992+1030+1042, usando um kit ELISA de involucrina comercialmente disponível (Biomedical Technologies). Lisados de tumor foram preparados pela homogeneização de 30 a 40 mg de tecidos de tumor em 1 mL de tampão RIPA usando o TissueLyzer da Qiagen. A concentração de proteína em cada lisado apurado foi determinada usando o ensaio ELISA em 0,4 µg de proteína de cada amostra.

[000344] Resultados: Como pode ser visto na *figura 27*, a involucrina é encontrada em níveis significativamente maiores no grupo de tratamento com 992+1030+1042 quando comparado com o controle negativo e os grupos de tratamento com Erbitux ou Vectibix. Portanto, a combinação dos anticorpos 992, 1030 e 1042 aumenta os níveis de involucrina nos tumores xeno-enxertados de A431-NS e, portanto, presumivelmente induz um grau maior de diferenciação de A431-NS. Um resultado que se correlaciona bem com o grande número de pérolas de queratina encontradas nesse grupo de tratamento em particular (Veja o exemplo 8).

Exemplo 13: Internalização de EGFR pela composição de anticorpo Sym004

[000345] Alguns anticorpos funcionam pela indução da internalização de seu alvo de superfície. O EGFR é conhecido por sofrer

internalização quando ativado pelo ligante tal como EGF.

[000346] A habilidade de uma mistura de dois anticorpos, 992 e 1024, em induzir a internalização de EGFR foi investigada usando microscopia confocal. Células A431-NS e HN5 foram semeadas em laminas em estojos de 8 poços da Lab Tek e incubadas por uma noite em DMEM contendo FBS 0,5%. As células foram adicionadas depois a 10 µg/mL de mistura de anticorpo 992+1024 marcada com Alexa-488 ou o anticorpo de controle Erbitux e incubadas por diferentes períodos de tempo. As imagens foram feitas com uma ampliação de 60x usando um microscópio confocal da Biorad tanto com um orifício grande quanto com um orifício pequeno.

[000347] Resultados: Como mostrado na *figura 29A*, a adição de anticorpos 992 e 1024 específicos para EGFR marcados com Alexa-488 por 2 horas levou ao acúmulo dos anticorpos em vesículas intracelulares em ambas as linhagens celulares A431-NS e HN5. Erbitux, ao contrário, é principalmente encontrado na superfície celular. A *figura 29B* mostra imagens de células A431-NS usando um orifício pequeno, o que resulta em imagens de seções mais finas das células. Está claro a partir dessas imagens que os anticorpos 992+1024 estão localizados dentro das células, enquanto que Erbitux é encontrado principalmente na superfície celular. A *figura 30* mostra o prazo da internalização mediado por 992+1024 e tão precoce quanto 30 minutos depois da adição dos anticorpos eles podem ser encontrados em vesículas intracelulares. Depois de 4 horas, quase todos os anticorpos 992+1024 são encontrados dentro das células com pouca ou quase nenhuma coloração superficial. Erbitux, ao contrário, permanece na superfície celular. Também foram obtidas evidências que mostram que a internalização induzida por 992+1024 leva a uma degradação sustentada e remoção de EGFR das células.

[000348] Portanto a combinação dos anticorpos 992 e 1024 induz

rápida e poderosamente a internalização de EGFR enquanto que Erbitux não o faz.

Exemplo 14: Medida das afinidades de anticorpo com ressonância de plasma de superfície

[000349] Medida de afinidades monovalentes de anticorpos IgG Sym004 contra ECD de EGFR solúvel.

[000350] A análise cinética de anticorpos IgG de extensão completa da invenção foi realizada em um BIACore 2000, empregando um ensaio como descrito em (Canziani, Klakamp, *et al.* 2004, Anal. Biochem, 325:301-307), que permite a medida de afinidades monovalentes de moléculas completas de IgG contra um antígeno solúvel. Resumidamente, aproximadamente 10.000 Ru de anticorpo policlonal anti-Fc de IgG foram conjugadas a superfície de um chip CM5 de acordo com as instruções do fabricante, seguia pela captura de 25 µg de anticorpos anti-EGFR individuais da invenção ou o controle negativo Synagis sobre a superfície do chip anti-Fc. A densidade da IgG capturada foi otimizada para cada clone tal que a ligação do antígeno de maior concentração empregado no ensaio não excedeu 25 Ru. Depois, 250 µL de ECD de EGFR solúvel humano, previamente mostrado conter apenas proteína monovalente por cromatografia de exclusão em gel, foram injetados em uma taxa de fluxo de 25 µL/min em diluições seriadas de duas vezes em tampão HBS-EP para gerar curvas de resposta. A superfície do chip foi regenerada entre ciclos pela remoção dos complexos capturados de anticorpo/antígeno com uma injeção em 10 segundos de 100 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. A análise cinética foi realizada primeiro pela subtração da resposta do fluxo celular contendo o anticorpo de controle negativo Synagis , seguida pela subtração da resposta gerada pela injeção de tampão HBS-EP apenas (“referência dupla”). A constante de associação (ka) e a constante de dissociação (kd) foram avaliadas globalmente a partir dos sensogramas gerados com o programa de

avaliação BIA 4.1 fornecido pelo fabricante.

[000351] Reagentes:

1. chip CM5; Biacore, Cat. No. BR-1000-14
2. NHS; Biacore BR-1000-50
3. EDC; Biacore BR-1000-50
4. Tampão acetato 10mM pH 4,5; Biacore, Cat. No. BR-1003-50
5. Anti-Fc de IgG humana de cabra; Caltag, Cat. No. H10500
6. Etanolamina, 1,0M pH 8,5; Biacore BR-1000-50
7. Tampão de corrida 10 x HBS-EP: HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensoativo P20 0,005% v/v
8. Antígeno: Domínio extracelular de EGFR humano com 6xHis.
9. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM

[000352] As afinidades monovalentes calculadas das IgGs de extensão completa da invenção contra ECD de EGFR humano solúvel são mostradas na Tabela 8 abaixo.

*Tabela 8. Afinidades medidas de anticorpos IgG anti-EGFR contra o receptor solúvel. As medidas dos anticorpos foram realizadas por Ressonância de Plasma de Superfície em um BIACore 2000 empregando o programa de avaliação fornecido pelo fabricante. \* A afinidade de 992 foi determinada pela Análise de Scatchard. NA. Não aplicável.*

IgG	k <sub>ON</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>off</sub> (1/s)	t <sub>1/2</sub> (min)	K <sub>D</sub> (nM)
992*	NA	NA	0,2	170,0
1024	1,8E+05	4,9E-03	2,4	26,7
1030	1,3E+04	3,7E-04	31,1	29,2
1254	8,1E+04	1,0E-03	11,3	12,7
1260	3,7E+04	1,6E-04	74,1	4,2
1261	1,7E+05	3,2E-03	3,6	18,6
1277	1,3E+05	5,3E-05	217,6	0,4
1284	3,2E+04	1,5E-04	78,1	4,6
1320	1,2E+05	2,8E-03	4,1	24,2
1347	2,4E+04	5,0E-04	22,9	214

[000353] A maioria dos anticorpos Sym004 testados reconheceu o ECD de GFR humano solúvel com afinidades na faixa de 10 – 20 nM, exceto 1260, 1277 e 1284 que tiveram afinidades maiores de 4,2 nM, 0,4 nM e 4,6 nM respectivamente. Finalmente, 992 foi encontrado se ligar ao ECD de EGFR solúvel com uma afinidade muito menor do que os outros anticorpos testados. Consequentemente, a análise cinética desse anticorpo teve que ser determinada pela análise de Scatchard que revelou uma afinidade de 170 nM contra o ECD de EGFR humano solúvel.

[000354] Medida das afinidades de Fab de anticorpos Sym004 contra ECD de EGFR recombinante imobilizado.

[000355] Para investigar as possíveis diferenças na apresentação do antígeno entre ECD de EGFR apresentado em forma solúvel e imobilizada, uma nova medida de afinidade sobre um antígeno de receptor de EGFR quimérico imobilizado, denominado EGFR-Fc (R&D Systems, 344-ER), que consiste em ECD de EGFR humano fundido com Fc de IgG humana, foi realizada. Para esse propósito, fragmentos Fab dos anticorpos IgG 992, 1024 e 1030 foram gerados para permitir a medida das afinidades monovalentes.

[000356] Produção de Fab:

[000357] Os fragmentos Fab de 992, 1024 e 1030 foram produzidos pela digestão com Papaína usando um kit de preparação de Fab da Pierce e seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 2 mg de cada anticorpo IgG foi trocado em tampão em colunas NAP-5 (Amersham Biosciences) com tampão de digestão recém preparado contendo Cisteína-HCl 20 mM, pH 7.,0 seguindo as instruções do fabricante. Depois, 350 µL de uma pasta de esferas de Papaína foram lavados duas vezes no mesmo tampão de digestão antes que as esferas fossem centrifugadas e o sobrenadante descartado. Os anticorpos foram digeridos pela adição de 1 mL de tampão de troca de

anticorpo IgG às esferas e incubação por uma noite a 37°C com agitação a 1000 rpm. Na manhã seguinte, IgG não digerida foi separada dos Fab brutos pela depleção de IgG de extensão completa sobre colunas HiTrap Protein A (GE Healthcare). O Fab produzido foi finalmente dialisado contra PBS por uma noite e analisado por SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. Uma banda de proteína de aproximadamente 50 kDa sob condições não redutoras foi tomada como uma indicação da produção bem sucedida de Fab.

[000358] Reagentes:

1. Kit de preparação ImmunoPure Fab; Pierce; No. cat. 44885
2. Coluna de dessalinização NAP5; Amersham, No. cat. 17-0853-02
3. PBS pH 7,2; Gibco; #20012-019
4. HiTrap Protein A HP, coluna de 1 mL; GE Healthcare; #17-0402-01
5. NuPAGE 4-12% Novex Bis-Tris Gel; Invitrogen; #NP0322BOX
6. Marcador molecular. Seeblue Plus 2; Invitrogen; #LC5925
7. Anticorpos anti-EGFR – 2,0 mg de cada

[000359] A análise cinética dos Fab de anticorpos da invenção foi realizada em um Biacore 2000 usando antígeno recombinante imobilizado sobre a superfície do sensor em uma densidade muito baixa para evitar as limitações do transporte em massa. Resumidamente, um total de 285 Ru de quimera recombinante ECD de EGFR-Fc (R&D Systems, No. Cat. 344-ER) foi conjugado a superfície de um chip CM% de acordo com as instruções do fabricante. Depois, os fragmentos Fab derivados dos anticorpos da invenção foram testados em diluições seriadas de duas vezes,

começando em uma concentração otimizada que não resultou em valores de Ru Max acima de 25, quando testados sobre o chip com EGFR imobilizado. A análise cinética foi realizada primeiro pela subtração da resposta gerada pela injeção apenas de tampão HBS-EP. A constante de associação ( $k_a$ ) e a constante de dissociação ( $k_d$ ) foram avaliadas globalmente a partir dos sensogramas gerados com o programa de avaliação BIA 4.1 fornecido pelo fabricante.

[000360] As afinidades calculadas dos fragmentos Fab testados da invenção contra ECD de EGFR humano imobilizado são mostradas na Tabela 9 abaixo.

*Tabela 9: Afinidades medidas de Fab de anticorpos anti-EGFR contra receptor imobilizado. As medidas dos anticorpos foram realizadas por Ressonância de Plasma de Superfície em um BIACore 2000, empregando o programa de avaliação fornecido pelo fabricante.*

\* A afinidade de 992 foi determinada pela análise de Scatchard. NA Não aplicável.

Fab	$k_{ON}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}$ (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	$K_D$ (nM)
Fab 992*	N.A.	N.A.	0,2	150,0
Fab 1024	1,9E+05	4,9E-03	2,3	25,6
Fab 1030	8,7E+04	2,0E-04	57,5	2,3

[000361] Como apresentado na Tabela 9 acima, os fragmentos Fab de 992 e 1024 foram encontrados ter afinidades de 150 nM e 26 nM, respectivamente em concordância com as afinidades apresentadas no exemplo anterior, ilustrando pequenas diferença no reconhecimento pelo anticorpo contra EGFR solúvel e imobilizado para esses dois anticorpos. Entretanto, o anticorpo 1030 exibiu uma afinidade dez vezes maior de 2,3 nM contra o antígeno imobilizado quando comparado ao receptor solúvel e, consequentemente, reconheceu preferencialmente um epítopo exposto sobre um antígeno imobilizado.

Exemplo 15: Investigação da apresentação de antígeno EGFR e

classificação das afinidades funcionais sobre células A431-NS.

[000362] Comparaçao entre a apresentação de antígeno sobre células A431-NS e o receptor EGFR de extensão completa purificado.

[000363] Como a análise cinética revelou que o anticorpo 992 reconheceu o ECD de EGFR recombinante com uma afinidade entre 150-170 nM, foi investigado se essa afinidade fraca era devida ao fato de que o mAb 992 preferencialmente se ligava à conformações nativas de EGFR como expressas sobre células A431-NS em oposição às conformações apresentadas de ECD de EGFR recombinante ou EGFR de extensão completa purificado de células A431. Para investigar as diferenças nas apresentações de antígeno do receptor de EGF, estudos de ligação por ELISA concomitantes de uma subpopulação dos anticorpos da invenção foram realizados com fragmentos Fab para evitar os efeitos de avidez sobre as células A431-NS e EGFR de extensão completa purificado das mesmas células.

Produção de Fab: A produção dos fragmentos Fab foi realizada como descrito no exemplo 14.

[000364] ELISA indireto: Para o ELISA indireto, EGFR de extensão completa (Sigma E2645) foi coberto com 1 $\mu$ g/mL de tampão Carbonato (50  $\mu$ L/poço) por uma noite a 4°C. Na manhã seguinte, os poços foram lavados duas vezes com PBS-T e bloqueados por uma hora com PBS-T contendo BSA 1% em temperatura ambiente, seguido por duas lavagens em PBS-T. Depois, 50  $\mu$ L de diluições seriadas de Fab de anticorpos em DMEM contendo BSA 1% foram adicionados a poços independentes de ELISA e incubados por 1 hora em temperatura ambiente, depois do que os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T. Depois, 50  $\mu$ L de um conjugado secundário de cabra anti-humano (específico para Fab)-HRP, diluído 1:5000 em DMEM contendo BSA 1%, foram adicionados e incubados em gelo por 30 min Finalmente, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T

e as placas desenvolvidas pela adição de 50 µL/poço de substrato TMB e lidas a 620 nm a cada 5-15-30 min. Depois da incubação, a reação foi paralisada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e a absorbância lida a 450 nm.

[000365] Reagentes, ELISA indireto:

1. Tampão de cobertura: tampão Carbonato 50 mM, pH 9,8
2. Antígenos: EGFR de tipo selvagem de extensão completa purificado de células A431; Sigma E2645
3. Placa de ELISA: NUNC Maxisorp; No. cat. 442404
4. Tampão de lavagem: 1 x PBS/Tween 20 0,05% (PBS-T)
5. Tampão de diluição/bloqueio: BSA 1% em PBS-T (PBS-T-BSA 1%)
6. Tampão de diluição de anticorpo: DMEM contendo BSA 1%
7. Conjugado de cabra anti-humano (específico para Fab)-HRP: Jackson, No. Cat. 109-035-097
8. Substrato TMB PLus: KemEn Tec, No. Cat. 4390L
9. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M

[000366] ELISA de célula: As afinidades relativas de ligação definidas como a concentração molar que fornece a metade da OD máxima (ED50) foram determinadas pelas titulações de anticorpos em células A431-NS. Resumidamente, 10.000 células A431-NS foram cultivadas em placas de ELISA de 96 poços contendo DMEM com adição de FCS 0,5% e P/S 1% a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% por uma noite. Na manhã seguinte, as células confluentes (aproximadamente 20.000 por poço) foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas pela incubação com solução de paraformaldeído 1% por 15 min em temperatura ambiente, seguida pela lavagem quatro vezes com PBS. Depois, os anticorpos para EGFR testados e o anticorpo de controle negativo Synagis foram diluídos seriadamente em DMEM contendo BSA 1% e

50 µL de cada diluição adicionados aos poços e incubados por 1 hora em temperatura ambiente, depois do que os poços foram lavados quatro vezes com PBS. Depois, 50 µL de um conjugado secundário de cabra anti-humano (específico para Fab)-HRP diluído 1:5000 em DMEM contendo BSA 1% foram adicionados e incubados sobre gelo por 30 min. Finalmente, os poços foram lavados quatro vezes com PBS e as placas desenvolvidas pela adição de 50 µL/poço de substrato TMB Plus e lidas a 620 nm a cada 5-15-30 min. Depois da incubação, a reação foi paralisada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e a absorbância lida a 450 nm. A afinidade funcional expressa como valores de ED50 foram calculadas pela subtração da média da ligação antecedente apenas com reagente secundário, seguida pela normalização das curvas de ligação pela plotagem % de ligação máxima em relação a cada anticorpo testado.

[000367] Reagentes, ELISA celular:

1. Meio DMEM: Gibco, No. Cat. 41966-029
2. FCS: Gibco, No. Cat. 10099-141
3. Penicilina/estreptomicina (P/S): Gibco, No. Cat. 15140-122
4. Placa de ELISA: Costar, No. Cat. 3595
5. Tampão de lavagem (PBS): Gibco, No. Cat. 20012-019
6. Tampão de diluição de anticorpo: DMEM contendo BSA 1%
7. Solução de fixação de célula: BD Biosciences, No. Cat. 340181
8. Conjugado de cabra anti-humano (específico para Fab)-HRP: Jackson, No. Cat. 109-035-097
9. Substrato TMB Plus: KemEn Tec, No. Cat. 4390L
10. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M

[000368] As diferenças na apresentação de antígeno sobre o

receptor de EGF expresso sobre células A431-NS e sobre o receptor purificado das mesmas células foram determinadas com estudos de ligação com ELISA concomitante, empregando o mesmo reagente de anticorpo secundário e tempos de incubação. Os resultados são mostrados na figura 31. O experimento mostrou claramente que Fab de anticorpos 992 e 1024 se ligam fracamente a poços de ELISA cobertos com EGFR de extensão completa purificado quando comparada com a ligação das mesmas concentrações de Fab 1030. Entretanto, essa atividade de ligação fraca de 992 e 1024 foi restaurada quando os anticorpos foram testados sobre células A431-NS contra todos os três Fabs mostrados com atividade de ligação acentuada. A comparação dos dois ELISAs diferentes ilustrou claramente uma preferência dos Fabs 992 e 1024 pela ligação com conformações nativas de EGFR quando expressas sobre superfícies celulares em oposição às conformações apresentadas sobre o antígeno purificado em poços de ELISA. O resultado também sugeriu que a afinidade fraca aparente de 992 medida com a ressonância de plasma de superfície em ECD de EGFR recombinante solúvel e imobilizado foi devida a apresentação desfavorável do epítopo do anticorpo 992 nos sistemas testados.

[000369] Classificação de afinidades funcionais de células A431-NS.  
 [000370] Os ELISAs de célula realizados como descrito acima foram usados para classificar as afinidades funcionais de IgG e fragmentos Fab de 992, 1024, 1030, Vectibix e Erbitux, pelo cálculo dos valores de metade da OD máxima expressos como valores de ED50. O resultado dessa análise é mostrado na *figura 32* e os valores calculados de ED50 são apresentados na Tabela 10 abaixo.

*Tabela 10: Classificação de afinidades funcionais expressas como valores de ED50 baseados nos efeitos de avidez de IgG ou da afinidade monovalente de Fab. Os valores de ED50 foram*

*determinados pelas titulações seriadas de anticorpo sobre células A431-NS. SD: desvio padrão de ajuste de curva.*

IgG Avidity	Avidez de IgG			Afinidade de Fab			
IgG	Log ED50	ED50 nM	SD	Fab	Log ED50	ED50 nM	SD
992	-0.56	0.3	0.04	992	1.00	9.9	0.11
1024	-0.49	0.3	0.05	1024	0.30	2.0	0.02
1030	0.17	1.5	0.02	1030	0.27	1.8	0.05
Vectibix	-0.15	0.7	0.04	Vectibix	0.08	1.2	0.04
Erbitux	-0.23	0.6	0.04	Erbitux	-0.07	0.8	0.06

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD	Fab	Log ED50	ED50 nM	SD
992	-0.56	0.3	0.04	992	1.00	9.9	0.11
1024	-0.49	0.3	0.05	1024	0.30	2.0	0.02
1030	0.17	1.5	0.02	1030	0.27	1.8	0.05
Vectibix	-0.15	0.7	0.04	Vectibix	0.08	1.2	0.04
Erbitux	-0.23	0.6	0.04	Erbitux	-0.07	0.8	0.06

[000371] O experimento mostra claramente que quando os efeitos da avidez foram levados em consideração, a Ig 992 e 1024 pareceram se ligar a células A431-NS com maior avidez do que os anticorpos Erbitux e Vectibix, enquanto que Ig 1030 tinha a menor afinidade dos anticorpos testados. Entretanto, quando a afinidade monovalente de células foi determinada usando fragmentos Fab, 992 teve a afinidade mais baixa, de aproximadamente 10 nM. Não obstante, essa afinidade monovalente funcional ainda foi 15 vezes menor do que testada com BIACore.

Exemplo 16: Investigação da intensificação da ligação induzida por anticorpo.

[000372] O experimento de competição BIACore realizado sobre pares de anticorpos da invenção revelou que a ligação de 992 e 1024 estava intensificada aproximadamente em 55% e 58%, respectivamente (*figura 9A*), quando esses anticorpos eram testados um contra o outro em ambas as direções. Para investigar esse fenômeno adicionalmente, um ELISA de célula que usa células não fixadas foi realizado para investigar o efeito da ligação de IgG de um clone de anticorpo antes da saturação do receptor com o fragmento Fab de um anticorpo que se liga a um epitopo não superposto.

[000373] ELISA de célula: O ELISA foi realizado essencialmente como descrito no exemplo 15 com modificações. As células foram

deixadas não fixadas para permitir a flexibilidade conformacional de EGFR depois das adições de anticorpo. Resumidamente, 10.000 células A431-NS foram cultivadas em placas de ELISA de 96 poços contendo DMEM com a adição de FCS 0,5% e P/S 1% a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% por uma noite. Na manhã seguinte, as células confluentes (aproximadamente 20.000/poço) foram lavadas duas vezes com PBS e os poços para a investigação da intensificação da ligação induzida por anticorpo foram pré-incubados com 25 µL de fragmentos Fab isolados de 992, 1024 ou 1030 ou 12,5 µL de 80 nM de cada Fab # isolado em combinações duplas que mostraram previamente fornecer ligação saturada. 25 µL de DMEM contendo BSA 1% foram adicionados aos poços usados para testar os anticorpos IgG sem fragmentos Fab adicionados. Depois da adição de Fab e meio, os poços de ELISA foram incubados por 30 min em temperatura ambiente, depois do que 25 µL de diluições seriadas três vezes de IgGs da invenção ou controle negativo Synagis, começando com uma concentração de 360 nM, foram adicionadas aos poços e incubadas em gelo por uma hora. Depois, os poços foram lavados quatro vezes com PBS e 50 µL de um conjugado secundário monoclonal de camundongo anti-humano (específico para Fc)-HRP diluído 1:5000 em DMEM contendo BSA 1% foram adicionados e incubados em gelo por 30 min. Finalmente, os poços foram lavados quatro vezes com PBS e as placas desenvolvidas pela adição de 50 µL/poço de substrato TMB Plus e lidas a 620 nm a cada 5-15-30 min. Depois da incubação com substrato, a reação foi paralisada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e a absorbância lida a 450 nm. A afinidade funcional expressa como valores de ED<sub>50</sub> foi calculada pela subtração da média da ligação antecedente apenas com reagente secundário, seguida pela normalização das curvas de ligação plotando o % de ligação máxima em relação a cada anticorpo testado.

[000374] Reagentes, ELISA celular:

1. Meio DMEM: Gibco, No. Cat. 41966-029
2. FCS: Gibco, No. Cat. 10099-141
3. Penicilina/estreptomicina (P/S): Gibco, No. Cat. 15140-122
4. Placa de ELISA: Costar, No. Cat. 3595
5. Tampão de lavagem (PBS): Gibco, No. Cat. 20012-019
6. Tampão de diluição de anticorpo: DMEM contendo BSA 1%
7. Conjugado de camundongo anti-humano (específico para Fc)-HRP: Ab-direct, No. Cat. MCA647P
8. Substrato TMB Plus: KemEn Tec, No. Cat. 4390L
9. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M

[000375] As investigações das intensificações de ligação induzidas por anticorpo foram determinadas pelos estudos de ligação ELISA concomitantes, empregando o mesmo reagente de anticorpo secundário e tempos de incubação. O resultado do estudo é mostrado na *figura 33* e os valores calculados de ED50 na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11: *Classificação de afinidades funcionais expressas como valores de ED50 baseada nos efeitos de avidez de IgG com ou sem saturação prévia do receptor com os fragmentos Fab listados. Os valores de ED50 foram determinados pelas titulações seriadas de anticorpo sobre células A431-NS. SD: desvio padrão de ajuste de curva.*

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
<b>IgG 992</b>	-0.24	<b>0.6</b>	0.07
<b>IgG 992 / Fab 1024</b>	-0.31	<b>0.5</b>	0.02
<b>IgG 992 / Fab 1030</b>	-0.38	<b>0.4</b>	0.05
<b>IgG 992 / Fab 1024 &amp; 1030</b>	-0.34	<b>0.5</b>	0.04

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
<b>IgG 1024</b>	-0.01	<b>1.0</b>	0.01
<b>IgG 1024 / Fab 992</b>	-0.05	<b>0.9</b>	0.04
<b>IgG 1024 / Fab 992 &amp; 1030</b>	-0.08	<b>0.8</b>	0.02

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
<b>IgG 1030</b>	0.33	<b>2.2</b>	0.06
<b>IgG 1030 / Fab 992</b>	0.20	<b>1.6</b>	0.03
<b>IgG 1030 / Fab 992 &amp; 1024</b>	0.34	<b>2.2</b>	0.06

[000376] Como apresentado na figura 33 e na Tabela 11 acima, IgG 992 mostrou uma intensificação clara da ligação antes da saturação do receptor com fragmentos Fab de 1024 ou 1030 ou de 1024 junto com 1030. A incubação com fragmentos Fab resultou em valores de ED50 diminuídos de 0,5; 0,4 e 0,5 nM, respectivamente, comparados com 0,6nM quando IgG 992 foi testada sozinha. Igualmente, IgG 1024 e 1030 também mostraram ligação aumentada quando as células eram saturadas primeiro com Fab 992 e apenas 1024 quando ambos os Fab 992 e 1030 eram adicionados às células antes da IgG. O resultado ilustra claramente os benefícios de haver mais do que um anticorpo contra epítopos não superpostos sobre o mesmo receptor alvo.

[000377] Afinidades funcionais discretamente menores foram determinadas nesse experimento quando comparadas com o exemplo 2. Esse resultado é provavelmente devido ao fato de que um reagente secundário diferente foi usado no presente exemplo e devido ao fato de que as IgGs testadas foram incubadas com células não fixadas

sobre gelo para evitar a internalização.

Exemplo 16B: Clonagem de EGFR de extensão completa de Cynomolgus

[000378] O EGFR de extensão completa de Cynomolgus incluindo o peptídeo de sinal foi clonado a partir do cDNA de Cynomolgus isolado da epiderme pelo uso de nested PCR e iniciadores específicos para a sequência derivados da sequência publicada de EGFR humano de extensão completa (GENBANK X00588, Ullrich, A. *Et al.* Nature 309(5967), 418-425 (1984)).

[000379] Reagentes de PCR:

cDNA de Macaco Cynomolgous isolado da epiderme da pele normal

CytoMol Unimed, Cat. No: ccy34218, Lote No: A711054.

Tampão de reação FastStart (10X): Roche, Cat. no: 03 553 361 001

Enzima FastStart: Roche, Cat. No. 03 553 361 001

Enzima Phusion: Finnzymes, F-530S (2 U/ $\mu$ L).

dNTP 25 mM: Bioline, Cat. No: BIO-39029

[000380] Iniciadores para a amplificação de EGFR de extensão completa de Cynomolgus incluindo a sequência de sinal Iniciador:

5' ATG: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO 135)

Iniciador STOP 3': 5'- TCATGCTCCAATAAATTCACTG -3' (SEQ ID NO 139)

[000381] Condições de PCR:

95°C/2 min, 40 ciclos: 95°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/3 min 30 seg com uma incubação final a 72°C por 5 min.

[000382] Iniciadores para nested PCR que amplificam EGFR de extensão completa de Cynomolgus e incorporam os sítios de restrição Not e Xho:

E579            Cyn            Not5'            5'            –  
 GGAGTCGGCGGCCGCACCATGCGACCCTCCGGGACGG-3 (SEQ  
 ID NO 140)

E580            Cyn            Xho5'            5'            –  
 GCATGTGACTCGAGTCATGCTCCAATAAATTCACTGC-3 (SEQ ID  
 NO 141)

[000383] Condições de PCR:

[000384] 95°C/ 2 min, depois 30 ciclos: 95°C/30 seg de fusão, 55°C/30 seg de anelamento, 72°C/3 min de alongamento. Depois de 30 ciclos, os produtos de PCR foram deixados alongar por um adicional de 10 min.

[000385] As reações de PCR foram realizadas com 0,5 µL de modelo e 0,1 µL de enzima Phusion, 0,4 µL de enzima FastStart em um volume total de 50 µL de tampão de reação com uma concentração final de 1 x tampão FastStart, 0,2 nM dNTP e 0,2 µM de cada iniciador.

[000386] Um fragmento de PCR com uma extensão aparente de aproximadamente 4000 pb foi obtido e clonado usando o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen, Parte No. 4506-41) e sequenciado. A sequência de DNA e de proteína de EGFR clonado de Cynomolgus são mostradas na figura 34. Um alinhamento de sequências de proteínas de EGFR humano e de EGFR de Cynomolgus mostrou 99,2% de identidade de sequência.

*Demonstração da reatividade cruzada de anticorpo entre EGFR de extensão completa de humano e de Cynomolgus pela análise FACS.*

[000387] EGFR de extensão completa humano e de Cynomolgus foram expressos sobre a superfície de células CHO pela transfecção estável e as células testadas quanto a ligação por um painel de anticorpos para EGFR seriadamente diluídos pela análise FACS. As determinações foram feitas sob condições dependentes de K<sub>D</sub>, pela

manutenção de um excesso molar de anticorpo que era pelo menos 5 vezes maior do que o número de moléculas de antígeno EGFR expressas sobre a superfície da célula de um número fixo de células em todas as séries de diluição do anticorpo. Esse ajuste permitiu a análise FACS da ligação do anticorpo com saturação completa de receptor para todas as concentrações de anticorpo testadas.

[000388] Resumidamente, a análise quantitativa FACS foi realizada sobre um arranjo BD FACS Bioanalyzer System para determinar o número de moléculas de EGFR expressas sobre a superfície de células CHO, transfectadas tanto com EGFR de extensão completa de humano quanto de Cynomolgus. A análise foi realizada pela titulação de IgG Erbitux marcada com PE sobre as células e determina o número de moléculas de PE equivalentes pela comparação com uma curva padronizada feita a partir de partículas de calibração Rainbow com densidade de PE conhecida. A análise quantitativa revelou que as células CHO transfectadas com EGFR exibiam aproximadamente 350.000 moléculas sobre a superfície de cada célula. Depois, diluições seriadas 5 vezes de anticorpos da invenção, começando com 5 nM, foram comparadas pela incubação com 10.000 células CHO transfectadas com EGFR em volumes crescentes, permitindo pelo menos um excesso molar de anticorpo de 5 vezes sobre a superfície exibida do antígeno de EGFR em cada determinação. Os anticorpos foram incubados com as células por 14 horas em um agitador, para promover a saturação completa do antígeno em todas as concentrações de anticorpo testadas, enquanto o tampão de FACS era adicionado com NaN<sub>3</sub> 0,02% e a temperatura mantida a 4°C para evitar a internalização do receptor. Depois da incubação, as células foram peletizadas a 1200 rpm por 5 min a 4°C e ressuspensas em 200 ul de tampão de FACS. Depois, as células foram coradas com um F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-Fc gama de IgG humana PE diluído 1:500 e

incubadas por 30 min a 4°C em um agitador. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes em tampão de FACS e analisadas em um arranjo BD FACS Bioanalyzer System com bloqueio de células CHO que expressam EGFR que apresentam propriedades de dispersão uniformes a frente/laterais.

[000389] Reagentes de FACS:

Partículas de calibração Rainbow: BD, no. cat. 559123

Tampão de FACS: 1x PBS + FCS 2% + NaN<sub>3</sub> 0,02%

F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-Fc gama de IgG humana PE: Jackson ImmunoResearch, no. cat. 109-116-170

[000390] O ensaio de ligação FACS descrito foi usado na determinação da reatividade cruzada dos anticorpos 992 e 1024 anti-EGFR e comparados com um anticorpo de controle IgG 1320, que não tem reação cruzada com EGFR de Cynomolgus. Como mostrado na *figura* 40 abaixo, o ensaio FACS descrito foi muito bom para discriminar os anticorpos que exibem boa reatividade cruzada entre EGFR de extensão completa de humano e de Cynomolgus (*figura* 40A, IgG992 e *figura* 40B, IgG1024) e anticorpos específicos para a espécie que reconhecem apenas o EGFR humano de extensão completa (*figura* 40C, IgG 1320). A Partir dessa análise, conclui-se que ambas IgG 992 e 1024 exibiam excelente reatividade cruzada contra ambos os EGFR de extensão completa de humano e de Cynomolgus expressos sobre a superfície de células CHO estavelmente transfectadas. A diferença na ligação entre EGFR de humano e cynomolgus é surpreendente a vista do alto grau de similaridade de sequência e sublinha a importância de testar anticorpos quanto a ligação à sequência alvo exata nos animais usados para estudos toxicológicos pré-clínicos.

Exemplo 17: Clones homólogos a 992, 1024 e 1030

[000391] O rastreamento de clones de anticorpo que se liga a EGFR,

baseado em ensaios imunossorbentes (ELISA e ensaios baseados em célula), levou a identificação de clones 992, 1024 e 1030 como descrito nos exemplos anteriores. Clones específicos para EGFR, homólogos a 992, 1024 e 1030 também foram identificados (tabela 12).

[000392] Os clones que pertencem ao mesmo cluster são esperados ter a mesma especificidade de ligação, mas podem se ligar com afinidades diferentes. Portanto, clones dentro do mesmo cluster podem substituir um ao outro nas composições de anticorpo da presente invenção, desde que as afinidades de ligação dos clones não difiram muito.

<b>Tabela 12</b>	<b>IGHV</b>						
<b>Cluster</b>	<b>Nome do Clone</b>	<b>Gene IGHV</b>	<b>Gene IGHJ</b>	<b>CDR3</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Número de mutações somáticas</b>	<b>Mutações somáticas</b>
<b>992</b>	<b>1209</b>	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYISSG DAMDYW	110	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	<b>1204</b>	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSG DAMDYW	111	5	H46P,G59D,G61R,G76A,H90Q
	<b>992</b>	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSG DAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	<b>996</b>	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSG DAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	<b>1033</b>	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSG DAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q
	<b>1220</b>	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYYVSSG DAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H90Q

<b>1030</b>	<b>1195</b>	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	K14R,M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	<b>1030</b>	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,K48R,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	<b>1034</b>	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,T55S,I56T,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	<b>1194</b>	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,D69G,I78M,K84R,T86I
	<b>980</b>	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	<b>981</b>	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
	<b>1246</b>	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	11	M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I

	<b>1223</b>	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYW	112	12	S32N,M39L,T55S,S58G,G59V,Y62T,T63Y,Y66-,Y67F,I78M,K84R,T86I
<b>1024</b>	<b>1031</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L
	<b>1036</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L
	<b>1042</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYYDDAMDYW	113	6	Y33H,K43Q,N57H,S74N,S84P,P94L
	<b>984</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYYDDAMDYW	113	7	Y33H,K43Q,N57H,S74N,T79A,S84P,P94L
	<b>1024</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEAMDYW	114	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L
	<b>1210</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L
	<b>1217</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L
	<b>1221</b>	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVMDYW	115	7	K14E,A17G,Y33H,N60S,T63N,L91F,P94L

Tabela 12 cont.	IGKV						
Cluster	Nome do Clone	GeneIGHV	GeneIGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutações somáticas	Mutações somáticas
992	1209	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	1204	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	992	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	996	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	7	T8A,A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
	1033	IGKV10-94*03	IGKJ2*01	CQQFTTSPPTF	117	8	A25T,I29V,S30G,Y87F,N93S,L94M,P96G,I99V
	1220	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	118	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94V,I99V
1030	1195	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	K27Q,Y36F,Q44L
	1030	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	1034	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	1194	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	980	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,Q48R
	981	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,H92Y
	1246	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
	1223	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L
1024	1031	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1036	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T85A
	1042	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	G84R
	984	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1024	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1210	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T17A
	1217	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1221	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	S32N
	1218	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	

Exemplo 18: Humanização de anticorpos 992 e 1024

[000393] Todos os anticorpos contêm o potencial de desencadear uma resposta antianticorpo humano. A resposta se correlaciona em alguma extensão com o grau de “humanidade” do anticorpo terapêutico aplicado. Não é possível predizer a imunogenicidade e dessa maneira, o antianticorpo humano, mas há uma tendência na direção de preferir anticorpos com um alto grau de humanidade para uso clínico. A humanidade dos anticorpos descritos na presente invenção pode ser aumentada pelo processo de humanização [Reichert JM. Monoclonal antibodies in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2001;19:819-822; Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB and Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2005;23: 1073-1078].

[000394] A humanização de um mAb de murino é obtida, a princípio, pelo enxerto das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) sobre as regiões estruturais humanas (Frs) dos domínios de IGHV e IGKV, com sequência intimamente relacionada por um processo comumente referido como enxerto de CDR (Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS and Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986;321:522-525). Entretanto, o simples enxerto de CDR de apenas as regiões hipervariáveis pode resultar em afinidade diminuída, por que alguns aminoácidos ou regiões estruturais fazem um contato crucial com o antígeno ou suportam a conformação das alças de CDR que se ligam ao antígeno [Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP and Waldmann TA. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989;86:10029-10033; Al-Lazikani B, Lesk AM and Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of

immunoglobulins. J Mol Biol, 1997;273:927-948]. Consequentemente, a humanização do anticorpo deve envolver o enxerto de ambas as alças de CDR do murino derivadas de regiões variáveis sobre uma estrutura humana intimamente homóloga enquanto mantém os resíduos chave estruturais de murino com influência documentada sobre a atividade de ligação ao antígeno (Winter, G. and W. J. Harris. "Humanized antibodies." Immunol.Today 14.6 (1993): 243-46). Vários métodos têm sido desenvolvidos e aplicados com sucesso para obter a humanização enquanto se mantém a afinidade e função do anticorpo (revisado em Almagro, J. C. and J. Fransson. "Humanization of antibodies." Front Biosci. 13 (2008): 1619-33). A humanização pode ser obtida por métodos racionais, por exemplo, enxerto de CDR, recapeamento, super-humanização, otimização do conteúdo de sequência humana, os quais recaem todos sobre a construção de alguns candidatos a anticorpos humanizados. A sequência de aminoácidos dos candidatos é baseada no conhecimento e predição da estrutura do anticorpo e na contribuição de aminoácidos individuais para a ligação ao antígeno, tanto diretamente e indiretamente através da estabilização da estrutura global das regiões interagentes do antígeno. Geralmente, os candidatos têm que ser refinados e alguns aminoácidos mutados de volta ao resíduo original de murino, por que cada anticorpo tem algumas restrições individuais imprevistas. Comum aos métodos é que várias rodadas sucessivas de planejamento, teste e replanejamento podem ser necessárias para reter a afinidade e as funções. São alternativos os métodos mais empíricos onde grandes bibliotecas combinatórias são geradas e os anticorpos com as características desejadas são enriquecidos a partir de uma associação de variantes pela seleção por métodos tais como apresentação em levedura ou fago ou métodos de rastreamento alternativos.

[000395] Anticorpos anti-EGFR descritos na presente invenção

podem ser humanizados pelo enxerto de CDR nas regiões V humanas. No cenário preferido, a região V humana é selecionada baseada na homologia com a região V original de murino. As regiões do gene V humano com outras características desejadas tais como baixa imunogenicidade também podem ser usadas. O presente exemplo descreve um método a ser usado na humanização de anticorpos quiméricos anti-EGFR 992 e 1024. As sequências humanizadas dadas na figura 41A foram geradas pelo enxerto das regiões de CDR definidas por IMGT de IGHV de 992 em IGHV1-46/IGHJ4 e IGKV de 992 em IGKV1-27/IGKJ1-01. As sequências de aminoácidos dadas na figura 41B foram geadas in silico pelo enxerto das regiões de CDR definidas por IMGT de IGHV de 1024 em IGHV1-2\*02/IGHJ6\*02 e IGKV de 1024 em IGKV2-28\*01/IGKJ2\*01. Genes artificiais que codificam os anticorpos humanizados especificados são sintetizados e inseridos no vetor de expressão de mamífero. Os anticorpos são expressos, purificados e testados quanto à atividade como descrito no Exemplo 3. Depois do teste inicial, a cinética de ligação de anticorpos humanizados pode ser determinada pela ressonância de plasma de superfície como descrito no Exemplo 4. Similarmente, a ligação a hEGFR expresso sobre a superfície das células pode ser determinada como descrito no Exemplo 15.

[000396] Se a atividade de ligação dos aminoácidos humanizados é significativamente menor do que a observada para os anticorpos originais, um esquema sequencial de retromutação será empregado para a regeneração da afinidade, começando com os resíduos estruturais humanizados localizados na zona de Vernier ou os resíduos propostos para suportar a estrutura se as regiões de CDR (Foote, J. and G. Winter. "Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops." J Mol.Biol. 224.2 (1992): 487-99; Padlan, E. A. "Anatomy of the antibody molecule." Mol. Immunol

31.3 (1994): 169-217.). Esses resíduos são na numeração IMGT para 992 IGHV, os aminoácidos números 13, 45, e 80; aminoácido 25 de 992 IGKV; aminoácidos 13, 45, 80 e 82 de 1024 IGHV; aminoácido 78 de 1024 IGKL. Esses mutantes podem ser construídos pelo uso de mutagênese direcionada ao sítio mediada por PCR usando métodos de biologia molecular padronizados. Os mutantes construídos serão testados como descrito acima. É esperado que esses conjuntos de candidatos resultem em anticorpos humanizados com propriedades de ligação ao antígeno mantidas. Entretanto, retromutações adicionais ou maturação por afinidade pela introdução de substituições de aminoácidos nas regiões de CDR pela mutagenese direcionada ao sítio não podem ser excluídas.

Exemplo 19: Anticorpo com domínio variável duplo

[000397] Uma proteína de anticorpo com domínio variável duplo (DVD) é manipulada pela fusão de domínios IGHV de 992 e 1024 em um atrás do outro por um ligante com 6 aminoácidos (ASTKGP) e os domínios IGKV de 992 e 1024 por um ligante com 5 aminoácidos (TVAAP) [Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, vis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcza E, Murtaza A and Ghayur T. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nature Biotechnol.* 2007;25:1290-1297]. As fusões do domínio duplo IGHV e IGKV são seguidas pelos domínios IGHC e IGKC, respectivamente. Em um anticorpo DVD de extensão completa (992L1024), IGHV e IGKV de 992 são N terminais, seguidos pelo ligante e IGHV e IGKV de 1024, respectivamente. Em um segundo anticorpo DVD de extensão completa (1024L992), IGHV e IGKV de 1024 são N terminais, seguidos pelo ligante e IGHV e IGKV de 992, respectivamente. O plasmídeo de DNA que codifica o anticorpo 992 e 1024 é usado como modelo para uma construção

mediada por PCR em duas etapas dos genes que codificam o DVD. As regiões que codificam os dois domínios variáveis de IGHV e IGKV são amplificadas primeiro separadamente tal que elas contêm regiões de extensão superpostas na posição da região que codifica o ligante (para as combinações de modelo e iniciador veja a Tabela 13 e a Tabela 14). O gene de IGKV que codifica o domínio variável proximal C terminal é amplificado tal que o gene que codifica o domínio constante da cadeia leve (IGKC) é incluído na sequência codificadora. As sequências codificadoras e de aminoácidos das subunidades dos anticorpos de domínio variável duplo são mostradas no Apêndice 3.

[000398] A primeira PCR é preparada com a seguinte mistura em cada tubo (reações de 50 µL) para obter a dada concentração final: 1 × tampão FastStart (Roche), mistura de dNTP (200 µM de cada), iniciadores (10 pmol de cada) (veja Tabela 14), FastStart High Fidelity Enzyme Blend (2,2 U; Roche) e 100 ng de plasmídeo de modelo (veja Tabela 14). A PCR foi submetida ao seguinte ciclo térmico: 2 min a 95°C, 20 × (30 seg a 95°C, 30 seg. a 55°C, 1 min a 72°C), 10 min a 72°C. Os produtos de PCR resultantes com os tamanhos corretos da primeira reação de PCR (VEJA Tabela 14) são purificados por eletroforese em gel preparatória e usados em uma segunda etapa onde os dois domínios variáveis são combinados por PCR de extensão de superposição. A segunda PCR, junção de fragmentos de DNA por PCR de extensão de superposição, é preparada com a seguinte mistura em cada tubo (reações de 50 µL) para obter a dada concentração final: 1 × tampão FastStart (Roche), mistura de dNTP (200 µM de cada), iniciadores (10 pmol de cada) (veja Tabela 14), FastStart High Fidelity Enzyme Blend (2,2 U; Roche) e modelo (100 ng de fragmento de PCR, veja Tabela 15). A PCR foi submetida ao ciclo térmico como definido acima. Os produtos resultantes da segunda etapa de PCR são purificados por eletroforese preparatória em gel de

agarose e tratados com as enzimas de restrição *Ascl* e *Xhol* para IGHV duplo e *Nhel* e *Notl* para IgKV duplo (IGKC incluído). Os fragmentos são ligados consecutivamente em um vetor de expressão de IgG de mamífero, 00-VP-002 (*figura 4*) pela digestão com enzima de restrição padronizada e procedimentos de ligação. O vetor de plasmídeo de expressão resultante é amplificado em *E. coli* e a preparação de plasmídeo é purificada por métodos padronizados. Os anticorpos DVD são expressos e purificados como no Exemplo 2 e caracterizados quanto à atividade como no Exemplo 3-13.

[000399] Outros ligantes podem ser testados se os anticorpos resultantes mostrarem atividade de ligação a hEGFR alvo reduzida ou nula.

Tabela 13 Iniciadores para a construção de anticorpos DVD de 992 e 1024

SEQ ID NO	Nome do iniciador	Sequência
121	3'JH	GGAGGCGCTCGAGACGGTACTGAGGTTCCCTGAC
122	992_5'VH	CCAGCCGGGCCGCGCCGAGGTCCAAC TG CAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTG
123	1024_5'VH	CCAGCCGGGCCGCGCCGAGGTCCAAC TG CAGCAGCCTGGGGCTGAAC TG
124	992_5'VK	catggaaatagctagccGACATT CAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTG
125	1024_5'VK	catggaaatagctagccGACATCGTGATGACACAAGCTGCATTCTCCAATC
126	Kappa3'	ACCGCCTCCACC GGCG CGCTT ATT AAC ACTCTCCCCTGTTG
127	992H_O3'	CTGGGGGCCCTGGTGCTGGCTGAC GAGACGGTACTGAGGTTC
128	1024H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCCAGGTCCAAC TG CAGCAGC
129	1024H_O3'	CGGGGCCCTGGTGCTGGCTGAC GAGACGGTACTGAG
130	992H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCGAGGTCCAAC TG CAGCAAC
131	992K_O3'	GTCTGGTGCCACAGTCGTTGATTCCAGCTTGGTG
132	1024K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATCGTGATGACACAAGC
133	1024K_O3'	GTCTGGTGCCACAGTCGTTGATTCCAGCTTGGTCC
134	992K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATT CAGATGACTCAGACTAC

Tabela 14 Combinações de iniciador e modelo para a 1<sup>a</sup> etapa de PCR para a construção de genes que codificam DVD de 992 e 1024

<b>DVD</b>	<b>Modelo para PCR</b>	<b>Iniciadores para amplificação do gene IGHV</b>		<b>Iniciadores para amplificação do gene IGKV</b>	
		<b>1<sup>a</sup> etapa de PCR</b>	<b>1<sup>a</sup> produto de PCR (tamanho em pb)</b>	<b>1<sup>a</sup> etapa de PCR</b>	<b>1<sup>a</sup> produto de PCR (tamanho em pb)</b>
992L1024	992	992_5'VH 992H_O3'	992HO (406 pb)	992_5'VK 992K_O3'	992KO (359 pb)
	1024	1024H_O5' 3'JH	HO1024 (381 pb)	1024K_O5' Kappa3'	KO1024* (702 pb)
1024L992	992	992H_O5' 3'JH	HO992 (393 pb)	992K_O5' Kappa3'	KO992 (687 pb)
	1024	1024_5'VH 1024H_O3'	1024HO (392 pb)	1024_5'VK 1024K_O3'	1024KO* (374 pb)

\*A sequência codificadora amplificada inclui o gene IGKC.

Tabela 15 Combinações de iniciador e modelo para 2<sup>a</sup> etapa de PCR, junção por extensão de superposição, para a construção de genes que codificam DVD de 992 e 0124

	IGHV			IGKV		
DVD	Modelo	Iniciadores	Produto (pb)	Modelo	Iniciadores	Produto (pb)
992L1024	992HO HO1024	992_5'VH 3'JH	766	992KO KO1024	992_5'VK Kappa3'	1040
1024L992	HO992 1024HO	1024_5'VH 3'JH	766	KO992 1024KO	1024_5'VK Kappa3'	1040

Exemplo 20: Estudo de toxicidade da administração intravenosa por 6 semanas em combinação com Erbitux em macaco Cynomolgus

[000400] *Objetivo do estudo:* O objetivo do estudo foi determinar a toxicidade do artigo de teste, 992+1024, depois da administração intravenosa uma vez por semana em macaco cynomolgus por 6 semanas.

[000401] Como a toxicidade é um fator que limita a dose na prática clínica com inibidores de EGFR como Erbitux e Vectibix, foi de grande importância em um estágio precoce avaliar a tolerabilidade de 992+1024 em dose clinicamente relevante. Isso enfatizou o fato de que 992+1024 parece ser atuante por um mecanismo diferente daquele de outros produtos que atingem EGFR. Isso poderia levar, potencialmente, a novos efeitos adversos ou a uma piora dos efeitos vistos com outros inibidores de EGFR.

[000402] Grupos de três macacos cynomolgus fêmeas foram tratados com doses IV semanais de 992+1024 de 4/2,7 e 12/8 mg/kg e 12/8 mg/kg de Erbitux por 6 semanas. As primeiras doses de 4 e 12 mg/kg sendo as doses de ataque e 2,7 e 8 mg/kg sendo as doses de manutenção administradas 5 vezes. A dose de 12/8 mg/kg é equivalente à dose clínica humana de Erbitux administrada na prática clínica.

### Projeto do Estudo

Número do Grupo	Descrição do Grupo	Nível da dose (mg/kg/dia)	Volume da dose (mL/kg)	Número de Animais Fêmeas
1	Controle	0	19 / 12#	1-3
2	992+1024 Baixa	4,2 / 2,7#	19 / 12#	4-6
3	992+1024 Alta	12,6 / 8#	19 / 12#	7-9
4	Erbitux	12,6 / 8#	19 / 12#	10-12

# O primeiro nível de dose é para a dose de ataque, o segundo nível é para administração do dia 8 para adiante

[000403] Os seguintes parâmetros foram acompanhados durante o estudo: Mortalidade, Sinais Clínicos, Pesos corporais, Consumo de alimento, Hematologia, Química clínica, Peso dos órgãos, Achados macroscópicos

### Resultados

**Mortalidade:** Não houve mortes não programadas durante o curso do estudo.

**Sinais clínicos:** Nenhum tratamento relatou observações clínicas adversas.

**Pesos corporais:** Não houve efeito do tratamento tanto com 992+1024 quanto com Erbitux sobre o peso corporal.

**Consumo de alimento:** Não houve efeitos óbvios sobre o consumo de alimento.

**Hematologia:** Não houve efeitos sobre os parâmetros hematológicos que sugerissem um efeito do tratamento tanto com 992+1024 quanto com Erbitux.

**Química clínica:** Não houve alterações nos parâmetros da química clínica que sugerissem um efeito do tratamento com qualquer artigo de teste.

[000404] Na semana 4, um animal tratado com 4,2/2,7 mg/kg de 992+1024/dia teve os níveis de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase aumentados em comparação aos valores do pré-tratamento. Esses níveis retornaram às faixas normais na semana 6. Na ausência de um efeito similar em outros animais tratados, a significância toxicológica desse aumento das enzimas hepáticas é desconhecida.

**Peso dos órgãos:** Não houve diferença de significância toxicológica no peso dos órgãos entre animais tratados e de controle.

**Achados macroscópicos:** Não houve observações consistentes notadas na necropsia que sugerissem um efeito de

992+1024 ou Erbitux.

**Conclusão preliminar:** Os dados preliminares mostram que 992+1024 foi bem tolerado nas doses testadas e nenhum efeito adverso relacionado ao tratamento foi observado.

**Exemplo 21: Inibição do crescimento de linhagens de célula de câncer de pulmão**

[000405] Linhagens celulares de câncer de pulmão são conhecidas por expressar EGFR com mutações no domínio de tirosina quinase (Steiner *et al.* Clin Cancer Res 13.5 (2007):1540-51). Por um método similar aquele usado no exemplo 6, a habilidade de uma combinação dos dois anticorpos 992 e 1024 em inibir o crescimento das linhagens celulares de câncer de pulmão HCC827 e H1975 que possuem mutações diferentes de EGFR foi investigada.

**Resultados**

[000406] Como pode ser visto na Tabela 16 e Tabela 17, a combinação de 992 e 1024 é capaz de inibir o crescimento de ambas as linhagens celulares. A combinação é superior aos anticorpos monoclonais 992 e 1024 e a Vectibix.

**Tabela 16 Valores de IC50 e inibição máxima do crescimento dos anticorpos contra a linhagem celular HCC827**

HCC827	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inibição máxima.
<b>Erbitux</b>	0,013	80 %
<b>Vectibix</b>	0,100	60 %
<b>992</b>	0,050	80 %
<b>1024</b>	0,034	40 %
<b>992+1024</b>	0,031	80 %

**Tabela 17 Valores de IC50 e inibição máxima do crescimento dos anticorpos contra a linhagem celular H1975**

H1975	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inibição Máxima.
<b>Erbitux</b>	0,010	30 %
<b>Vectibix</b>	0,141	30 %
<b>992</b>	0,056	30 %
<b>1024</b>	-	0 %
<b>992+1024</b>	0,024	30 %

**Exemplo 21: Eficácia sobre células resistentes a Erbitux**

[000407] Para investigar se a composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024 pode inibir células resistentes a Erbitux, células HN5 resistentes a Erbitux foram geradas pela exposição contínua de células HN5 parentais a níveis crescentes de Erbitux. Uma vez que uma associação de células resistentes a Erbitux foi gerado, os efeitos inibitórios de Erbitux, Vectibix e uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024 foram testados usando um ensaio de viabilidade com WST-1.

**Método**

[000408] Células HN5 resistentes a Erbitux foram geradas a partir da linhagem celular HN5 de cabeça e pescoço humana sensível a Erbitux (cetuximab) pela exposição prolongada a concentrações crescentes de Erbitux durante períodos de 6 meses. Começando com uma dose inicial que corresponde a IC50 de cetuximab (0,05 µg/mL), a dose de exposição foi progressivamente aumentada até que as células começaram a proliferar com sucesso no meio contendo 10 µg/mL de Erbitux. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com FBS 10% e concentrações apropriadas de Erbitux e passadas duas vezes por semana.

[000409] O Reagente de Proliferação Celular WST-1 é um substrato pronto para uso que mede a atividade metabólica de células viáveis e é presumido que a atividade metabólica se correlacione com o número de células viáveis. Nesse exemplo, o ensaio com WST-1 foi usado para medir o número de células metabolicamente ativas depois do tratamento com diferentes anticorpos em diferentes concentrações.

[000410] Antes de realizar o ensaio com WST-1, os anticorpos apropriados e misturas de anticorpo foram diluídos até uma concentração final total de anticorpo de 20 µL/mL em meio apropriado suplementado com 0,5% de FBS e 1% de P/S fornecendo uma

concentração final de anticorpo de 10 µg/mL no poço contendo a mais alta concentração de anticorpo. 150 µL dessas soluções foram adicionadas a poços na coluna 2 de uma placa de 96 poços e uma diluição em série de três vezes foi feita até a coluna 9 tal que cada poço continha 100 µL de solução de anticorpo. 100 µL de meio foram adicionados à coluna 11. 200 µL de meio foram adicionados às Fileiras 1 e 8, assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito de evaporação do meio nos poços experimentais.

[000411] Células HN5 parentais e HN5 resistentes foram lavadas então com 1 xPBS e separadas por tripsinização com uma solução de 3 mL de tripsina. 17 mL de meio completo foram então adicionados e as células foram centrifugadas a 300 xg (1200 rcf) por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em DMEM + FBS 0,5%. As células foram contadas e sua concentração ajustada para 15000 células/mL. 100 µL da suspensão celular (1500 células/poço) foram adicionadas aos poços experimentais nas colunas 2-11. As placas foram incubadas por 4 dias em uma incubadora umidificada a 37°C. Depois, 20 µL de reagente WST-1 foram adicionados por poço e as placas incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram então transferidas para um agitador orbital de placa por uma hora. A absorbância foi medida a 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em um leitor de ELISA. A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) foi calculada como um percentual do controle não tratado, usando a mesma fórmula como a usada no Exemplo 6.

A IC<sub>50</sub> de cada mistura foi calculada usando GraphPad Prism pelo ajuste das curvas de titulação para a equação

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom})/(1+10^{((\text{LogIC50}-X)*\text{HillSlope})}).$$

### Resultados

[000412] Os resultados das titulações são mostrados na figura 43

para ambas as linhagens células parentais HN5 e células resistentes a Erbitux. É evidente que a potencia e a eficácia de Erbitux diminuíram significativamente nas células resistentes a Erbitux quando comparadas com as células parentais. A eficácia de Erbitux e Vectibix diminuiu cerca de 50% e a IC 50 aumentou mais do que dez vezes (Tabela 18). Em contraste, a potencia de uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024 (Sym004) diminuiu apenas 43% e a IC50 aumentou por um fator de 2. Esses resultados mostram que uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024 é mais potente e inibe o crescimento de células HN5 resistentes a Erbitux com uma eficácia maior do que Erbitux e Vectibix.

Tabela 18. Valores de IC50 e eficácia da inibição de células HN5wt e HN5 resistentes a Erbitux pelos anticorpos indicados. ND: Não determinado

	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )		Eficácia (%) de não tratado)	
	HN5 parental	HN5 Resistente a Erbitux	HN5 parental	HN5 Resistente a Erbitux
<b>Erbitux</b>	0,050	0,750	88,1%	34,4%
<b>Vectibix</b>	0,035	0,500	88,3%	32,3%
<b>992</b>	0,420	ND	85,5%	1,7%
<b>1024</b>	0,048	ND	84,8%	1,3%
<b>992+1024 (Sym004)</b>	0,053	0,110	88,2%	45,0%

Exemplo 22: Retratamento *in vivo* usando uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024

### Método

[000413]  $1 \times 10^6$  células A431-NS foram injetadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos fêmeas BALB/c nu/nu com 6 a 8 semanas de idade. Os tumores foram medidos uma a três vezes por semana com calibradores e o volume do tumor (V) foi calculado usando a seguinte fórmula:  $V = (\text{largura})^2 \times (\text{comprimento}) \times 0,5$ . O tratamento foi iniciado quando os tumores atingiram um volume médio

do tumor de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup> e os camundongos foram tratados com 1 mg dos anticorpos 992+1024 por via intraperitoneal duas vezes por semana para um total de nove injeções. Depois do período do tratamento inicial, os camundongos foram acompanhados por 159 dias. Se o crescimento do tumor fosse detectado durante esse período, os camundongos eram retratados com 1 mg de anticorpos 992+1024 duas vezes por semana até o término do estudo.

### Resultados

[000414] Todos os tumores responderam às quatro semanas iniciais da terapia (*figura 44*). O crescimento exponencial do tumor foi paralisado e os tumores regrediram para volumes do tumor entre 0 e ~ 200 mm<sup>3</sup>. Daí por diante, o volume do tumor ficou estável por mais de 85 dias antes que três dos nove tumores voltasse a crescer. Os três tumores, que eram de tamanhos variáveis antes do início da segunda rodada do tratamento, foram tratados com 1 mg de anticorpos 992+1024 duas vezes por semana pelo resto do período do estudo. Em todos os três casos, o re-tratamento resultou em uma regressão imediata do tumor, indicando que os tumores não se tornaram resistentes ao tratamento depois das quatro semanas iniciais de tratamento com a composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024.

Exemplo 23: Tratamento *in vivo* de responsivos parciais a Erbitux usando uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024

### Método

[000415]  $1 \times 10^6$  células A431-NS foram injetadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos fêmeas BALB/c nu/nu com 6 a 8 semanas de idade. Os tumores foram medidos uma a três vezes por semana com calibradores e o volume do tumor (V) foi calculado usando a seguinte fórmula:  $V = (\text{largura})^2 \times (\text{comprimento}) \times 0,5$ . Quando os tumores atingiram um volume médio do tumor de

aproximadamente 130 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram divididos em dois grupos de 10 e 30 animais. O grupo com 10 animais foi tratado com um anticorpo de controle, enquanto que o grupo com 30 animais foi tratado com 1 mg de Erbitux para um total de 3 doses. Nesse ponto, o grupo tratado com Erbitux foi dividido em dois grupos balanceados de 12 animais com um tamanho médio do tumor de 500 mm<sup>3</sup>. Os dois grupos de animais foram tratados tanto com 1 mg de anticorpos 992 + 1024 duas vezes por semana quanto continuaram com o tratamento com Erbitux. Seis animais isolados foram retirados do estudo.

### Resultados

[000416] O tratamento inicial com Erbitux inibiu parcialmente o crescimento do tumor de A431-NS (*figura 45*). Depois de 11 dias de tratamento com Erbitux, metade dos animais foram mudados para o tratamento com uma composição de anticorpos com os anticorpos 992 +1024 (Sym004 na legenda da figura). No grupo de camundongos que foi trocado para o tratamento com anticorpos 992 +1024, uma regressão significativa do tumor foi observada comparada com o grupo que continuou o tratamento com Erbitux. Esse efeito claro de uma composição de anticorpo com os anticorpos 992 +1024 sobre grandes tumores pré-tratados com Erbitux, indica que uma composição de anticorpo com os anticorpos 992 +1024 é mais potente do que Erbitux no modelo de A431-NS e que uma composição de anticorpo com os anticorpos 992 +1024 pode ser uma opção de tratamento em responsivos parciais a Erbitux.

### Exemplo 24: Tratamento *in vivo* de células resistentes a Erbitux

[000417] Para investigar adicionalmente se o fármaco candidato Sym004 pode inibir células resistentes a Erbitux, clones de HN5 resistentes a Erbitux foram gerados a partir de uma associação de célula HN5 resistente ao Erbitux. Os clones foram gerados por diluição limitada e uma vez que os clones resistentes a Erbitux foram gerados,

os efeitos inibitórios de Erbitux, Vectibix e Sym004 foram testados usando um ensaio de viabilidade WST-1.

### Método

[000418] Clones HN5 resistentes a Erbitux foram gerados a partir de uma associação de células resistentes a Erbitux (veja o exemplo 21) por diluição limitante. A clonagem por diluição limitante é um procedimento para a separação de células baseado na presunção de que se uma suspensão de células é diluída com meio de cultura suficiente, uma concentração de células será produzida tal que um volume exatamente medido da suspensão diluída conterá 1 célula. Quando esse volume da suspensão diluída é colocado em poços separados de uma placa de 96 poços, cada poço deve receber 1 célula/poço. Se essa célula permanece viável (camadas de células alimentadoras e/ou meio “condicionado” são geralmente necessários devido à óbvia baixa densidade celular de 1 célula/poço) e prolifera, então um clone de células isoladas terá sido estabelecido no poço. As células foram cultivadas em DMEM, suplementado com FBS 10% e concentrações apropriadas de Erbitux.

[000419] O Reagente de Proliferação Celular WST-1 é um substrato pronto para uso que mede a atividade metabólica de células viáveis e é presumido que a atividade metabólica se correlacione com o número de células viáveis. Nesse exemplo, o ensaio com WST-1 foi usado para medir o número de células metabolicamente ativas depois do tratamento com diferentes anticorpos em diferentes concentrações.

[000420] Antes de realizar o ensaio WST-1, os anticorpos e misturas de anticorpos apropriados foram diluídos até uma concentração final total de anticorpo de 20 µg/mL em DMEM suplementado com FBS 0,5% e P/S 1%, fornecendo uma concentração final de anticorpo de 10 µg/mL no poço com a concentração mais alta de anticorpo. 150 µL dessas soluções foram adicionadas a poços da coluna 2 de uma placa

de 96 poços e uma diluição em série de três vezes foi feita até a coluna 9 tal que cada poço continha 100 µL de solução de anticorpo. 100 µL de meio foram adicionados à coluna 11. 200 µL de meio foram adicionados às Fileiras 1 e 8, assim como nas colunas 1 e 12 para diminuir o efeito de evaporação do meio nos poços experimentais.

[000421] As células HN5 parentais e HN5 resistentes foram lavadas com 1 x PBS e separadas pela tripsinização com 3 mL de solução de tripsina. 17 mL de meio completo foram então adicionados e as células centrifugadas a 300 xg (1200 rcf) por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células ressuspressas em DMEM + FBS 0,5%. As células foram contadas e suas concentrações ajustadas para 15.000 células/mL. 100 µL da suspensão de célula (1500 células/poço) foram então adicionadas aos poços experimentais nas colunas 2-11. As placas foram incubadas por 4 dias em uma incubadora umidificada a 37°C. Depois, 20 µL de reagente WST-1 foram adicionados por poço e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram transferidas para um agitador orbital de placas por uma hora. A absorbância foi medida a 450 e 620 nm (comprimento de onda de referência) em um leitor de ELISA. A quantidade de células metabolicamente ativas (MAC) é calculada como um percentual dos controles não tratados, como se segue:

$$\%MAC = \left( 1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

A IC50 de cada mistura foi calculada usando GraphPad Prism pelo ajuste das curvas de titulação para a equação

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((LogIC50 - X) * HillSlope)})$$

## Resultados

[000422] Os resultados das titulações são mostrados na figura 46 para quatro clones representativos. É evidente que os clones possuem níveis diferentes de resistência a Erbitux. Entretanto, Sym004 é

superior na inibição do crescimento de todos os quatro clones quando comparado com Erbitux e Vectibix. A superioridade ficou evidente como uma eficácia (clones #7, #11 e #14) e/ou como potencia aumentadas (clones #8, #11 e #14) (Tabela 19).

*Tabela 19. Valores de IC<sub>50</sub> e eficácia da inibição dos quatro clones de HN5 resistentes a Erbitux pelos anticorpos indicados. \*Valores de IC<sub>50</sub> não podem ser comparados devido à diferença no nível máximo de inibição.*

<b>Potencia IC<sub>50</sub> (μg/mL)</b>					
	<b>HN5</b>	<b>Clone</b>	<b>Clone #8</b>	<b>Clone</b>	<b>Clone</b>
	<b>parental</b>	<b>#7</b>		<b>#11</b>	<b>#14</b>
<b>Erbitux</b>	0,050	0,016*	1,06	0,366*	0,314*
<b>Vectibix</b>	0,035	0,023*	2,70	0,311*	0,190*
<b>Sym004</b>	0,053	0,029*	0,33	0,267*	0,110*
<b>Eficácia (% inibição máxima)</b>					
	<b>HN5</b>	<b>Clone</b>	<b>Clone #8</b>	<b>Clone</b>	<b>Clone</b>
	<b>parental</b>	<b>#7</b>		<b>#11</b>	<b>#14</b>
<b>Erbitux</b>	88,1%	60,9%	42,5%	35,7%	32,0%
<b>Vectibix</b>	88,3%	61,1%	51,3%	28,6%	33,7%
<b>Sym004</b>	88,2%	70,3%	57,5%	38,9%	43,5%

Exemplo 25: Tratamento *in vivo* de células HN5 resistentes a Erbitux usando Erbitux e uma composição de anticorpo com os anticorpos 992+1024

#### Método

[000423] 5\*10<sup>6</sup> células do clone #7 de HN5 resistente a Erbitux foram inoculadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos fêmeas nus atípicos com seis a oito semanas de idade. Os tumores foram medidos duas vezes por semana com calibradores e o volume do tumor em mm<sup>3</sup> foi calculado de acordo com a fórmula: (largura)<sup>2</sup> c (comprimento) x 0,5. O tratamento foi iniciado sequencialmente

quando os tumores alcançaram um tamanho médio de ~650 mm<sup>3</sup>. Os camundongos foram tratados com 50 mg/kg de Sym004 ou Erbitux por injeções intraperitoneais duas vezes por semana por três semanas. Depois de três semanas de período de tratamento, os camundongos foram acompanhados por cinco semanas.

### Resultados

[000424] Depois de três semanas de terapia com Sym004, ambos os tumores do grupo de Sym004 estavam completamente eliminados (*figura 47*). Dois dos três camundongos tratados no grupo com Erbitux foram apenas parcialmente responsivos ao tratamento. Isso indicou que os tumores que eram parcialmente resistentes/não responsivos ao tratamento com Erbitux podiam ser eficientemente tratados com Sym004. Portanto, o mecanismo de resistência adquirida contra Erbitux não afeta a eficácia de Sym004.

### Apêndice 1 1. Sequencias da região variável de anticorpo

>992VH (Seq. no. 24)

cgcgccgaggccaactgcagcaacctgggtctgagctggtgaggcctggagcttcagtgaagc  
tgtcct

gcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggaca  
aggcct

tgagtggattggaatatttatcctggtagtcgtactaactacgtatgagaagttaagagcaag  
gcc

acactgactgttagacacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgagg  
actctg

cggcttattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactgg  
gtca

aggaacctcagtcaccgtctcg

>1024VH (Seq. no. 25)

cgcgcccccaggccaactgcagcagcctggggctgaactggtgaggcctggggttcagtgaag  
ctgtcct

gcaaggcttctggctacaccctcaccagtcaactggatgcactgggtgaagcagaggcctggaca  
aggcct  
tgagtggataggtgagattaatcctagcagcggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagta  
aggcc  
acactgactgtagacaaatcctccagcacgcctacatgcaattcagcagcctgacatctgagg  
actctg  
cggtctattattgtgttaagatactatggttacgacgaagctatggactactggggtcaaggaacctc  
agt  
caccgtctcg  
**>1030VH (Seq. no. 26)**  
cgccgccgaagtgcagctggggagtcgtggggggggcttagtgaagcctggagggtccctgaaa  
ctctcct  
gtgcagcctctggattcacttcagtagttatgccctgtctgggtcgccagactccagagaggagg  
ct  
ggagtgggtcgcatccattagtggtgtggtagcacctacttccagacagtgtgaagggccgttc  
acc  
atgtccagagataatgccaggaacatcctgtacccatggacttccagacagtgtgaagggccgttc  
cggcca  
tgtattactgtgcaagagggtctgatggttacttctatgctatggactactggggtcaaggaacctcag  
t  
caccgtctcg  
**>1042VH (Seq. no. 27)**  
cgccgcccagggtgcagctcagcagcctggggctgaactggtaagcctggggcttcagtgaagc  
tgtccct  
gtaaggcttctggctacaccctcaccagccactggatgcactgggtgcagcagaggcctggaca  
aggcct  
tgagtggattggagagattcatcctagcaacggtcgtactaactacaatgagaagttcaagaaca  
aggcc  
acactgactgtagacaaatctccagcacgcctacatgcaactcagcagttgacatctgagga  
ctctg

cggcttattactgtgcaagatactatggttacgacgtatggactactggggtaaggaacctc  
 agt  
 caccgtctcg  
 >1208VH (Seq. no. 28)  
 cgccgcgaagtgcagctggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaa  
 ctctcct  
 gtgcagcctctggattcgcttcagtagctatgacatgtctgggtcgccagactccggagaagag  
 gct  
 ggagtgggtcgcatatggtagtggtgatgataataccactatccagactctgtgaagggccg  
 attc  
 accatctccagacacaatgccaaaaacaccctatacctgcaa atgagcagtctgaagtctgagg  
 acacag  
 ccatgttattactgtgcaagacagaatggtaactacggggacactatggactactgggtcaa  
 ggaac  
 ctcagtcaccgtctcg  
 >1229\VH (Seq. no. 29)  
 cgcccccagggtcagtaaggagtcaaggacctggcctggcgccctcacagagcctgtcca  
 tcactt  
 gctctgtctctggttttcattaaccatctatggtagtacactgggtcgccagcctccaggaaagggtct  
 ggagtggctggagttatgtggctgggaaatacagattataattcgctcatgtccagactg  
 aac  
 atcagcaaggacaattccaagagccaagtttctaaaagtgaacagtctacaaactgtacac  
 agcca  
 tgtactattgtaccagagatcccgatggttactacgtgggtggtttcgatgtctgggccccggg  
 ac  
 cacggtcaccgtctcg  
 >1254VH (Seq. no. 30)  
 cgccgcgaagtgcagctggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaa  
 ctctcct  
 gtgcagcctctggattcgcttacagtagcttacatgacatgtctgggtcgccagactccggagaagag

gct  
 ggagtgggtcgatacattagtagtggtggatgccgcctactatcccacactgtgaaggcc  
 gattc  
 accatctccagagacaatgccaaaaacaccctatacctgcaa atgaggcagtctgaagtctgagg  
 acacag  
 ccatgtattactgtcgaggctcgatggaaactacggggacgctatggactactgggtcaag  
 gaac  
 ctcagtcaccgtctcg  
**>1257VH (Seq. no. 31)**  
 cgccgcgaggccagctgcaacagtctggacctgagctggtaaacctggggcttcagtgaaga  
 taccct  
 gcaagactctggatacacttcactgactacaacatggcctgggtgaaggcagccatggaaa  
 gagcct  
 tgagtggattggagatattattcctaacaatggtggctatctacaaccagaattcaaggcaa  
 ggcc  
 actttgactgttagacaaatcctccagtcacgcctccatggagctccgcagcctgacatctgagga  
 cactg  
 cagtcattctgtcaagaagaatatctactataggtacgacggggcaggtgctctggactactg  
 ggg  
 tcaaggaacctcagtcaccgtctcg  
**>1260VH (Seq. no. 32)**  
 cgcccccaggtgcagctgaaggagtcaaggacctggcctggtgccgcacagacgcctgtcc  
 atcactt  
 gcactgtctctgggtttcattaaccacctatgggtacactgggtcgccagcctccaggaaagg  
 tct  
 ggagtggctggagtaatatggctggtaaggcacaattataattcgctcatgtccagact  
 gagc  
 atcaagaaagacaactccaagagccaagtttctaaaaatgaacagtctgcaaactgatgaca  
 cagcca  
 tgtactactgtgccagagcctatggttacaactttgactattggggccaaggcaccactcacagt

ctc

g

>1261VH (Seq. no. 33)

cgcgccgaagtgcagctggaggctggggggcttagtgaagcctggagggtccctgaaa  
ctctcct

gtgcagtctctggattcacttcagtagctatgtcatgtctgggtcgccagactccggagaagagg  
ct

ggagtgggtcgcaaccattacttagtggtaggaacatctactatctagacagtgtgaaggggc  
gattc

actatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaattgagcagtctgagg  
acacgg

ccatgtattactgtgcaagacatgaggactataggtacgacggttactatgctatggactactgggg  
tca

aggaacacctcagtcaccgtctcg

>1277VH (Seq. no. 34)

cgcgccgaagtgcagctggaggctggggggcttagtgaagcctggagagtccctgaaac  
tctcct

gtgcagcctctggattcgcttcagttactctgacatgtctgggtcgccagactccggagaagagg  
ct

ggagtgggtcgcatatgagtagtgctggatgtcaccttctattcagacactgtgaagggccg  
attc

accatctccagagacaatgccaagaacaccctgtatctgcaagtgagcagtctgaagtctgagg  
acacag

ccatatattactgtgtaagacaccggacgtggctatggactactgggtcaaggaacacctcagtc  
accgt

ctcg

>1284VH (Seq. no. 35)

cgcgcccaaggccaactgcagcagcctggggctgaactggtaagcctggggcttcagtgaag  
ctgtcct

gcaaggcttctggctacacacccaccagcgactggatgcactggatgaaacagaggcctggaca

aggcct  
 tgagtggattggagagattaatcctagtaacggtcgttagtacaatgagaagtcaagagca  
 aggcc  
 acactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgagg  
 actctg  
 cggtctattactgtgcaagaataggtggtatctacgtggagacttactggggccaagggactctgg  
 cac  
 tgtctcg  
 >1308VH (Seq. no. 36)  
 cgcgccgaggtccagttcagcagtctggagctgagctggtgaggcctggcctcagtgaagat  
 ttccct  
 gcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaggcagaggcctggacag  
 ggtct  
 tgagtggattggacagatttatcctggagatggatactaactacaatggaaagtcaaggtag  
 agcc  
 acactgactgcaaacaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctaacatctgagg  
 actctg  
 cggtctattctgtgcaagaagggcatttcccttatgatgttaccctactacttgactactgggg  
 ccaaggcaccacttcacagtctcg  
 >1320VH (Seq. no. 37)  
 cgcgcccaggtccaaactgcagcagcctgggctgaactggtaagcctgggcttcaatgaag  
 ctgtcct  
 gcaaggcttctggctacacccatcaccactactggatgcactgggtgaagcagaggcctggaca  
 aggcct  
 tgaatggattggagaaattaatcctagcaacggtcgtactaattacaatgagaagtcaagagca  
 aggcc  
 acactgactgtagacaaatcgtccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgagg  
 actctg  
 gggtctattactgtgcaaaagggggaactactatgattacgactggactactggggccaaggc  
 accac

tctcacagtctcg

>1344VH (Seq. no. 38)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagttaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtcc  
atcacatt

gcactgtctctgggtttcattaaccatctatggtgtacactgggtcgccagcctccagggaaagggt  
ct

ggagtggctggagtaatatggctggtgaaacacaaaattataattcggtctcatgtccagact  
gagc

atcagcaaagacaactccaagagtcaagtttctaaaaatgaacagtctgcaaactgtacac  
agcca

tgtacttctgtgccagaggctatggctacaatttagactattgggccaaggcaccacttcacagtctc  
g

>1347VH (Seq. no. 39)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagttaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtcc  
atcacat

gcaccgtctcaggattctcattaaccggccatgggtaaactgggtcgccagcctccagggaaag  
ggtct

ggagtggctggaatgatgatgggggtatggaaagcacggactataattcaactctcaaattccaga  
ctgagt

atcagcaaggacaactccaagagccaagtttctaaaaatgaacagtctgcaactgtacac  
ccgcca

ggtactactgtgccagaggctacggctacccattactactttgactactggggccaaggcaccact  
cac

agtctcg

>992VH (Seq. no. 40)

RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQ  
GLEWIGNIYPGSRST

NYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVS  
SGDAMDYWGQGTS

VTVS

>1024VH (Seq. no. 41)

RAQVQLQQPGAEVLVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPG  
QGLEWIGEINPSSGRN

NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDEA  
MDYWGQGTSVTVS

>1030VH (Seq. no. 42)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYALSWVRQTPERR  
LEWVASISGVGSTY

FPDSVKGRFTMSRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGSDGYFY  
AMDYWGQGTSVTVS

>1042VH (Seq. no. 43)

RAQVQLQQPGAEVLVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVQQRPG  
QGLEWIGEIHPSNGRT

NYNEKFKNKATLTVDKSPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYYGYDD  
AMDYWGQGTSVTVS

>1208VH (Seq. no. 44)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEK  
RLEWVAYIGSGDDNT

HYPDSVKGRFTISRHNANKTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQKYGNY  
GDTMDYWGQGTSVT

VS

>1229VH (Seq. no. 45)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCSVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGL  
EWLGVMWAGGNTD

YNSALMSRLNISKDNSKSQVFLKVNSLQTDDTAMYYCTRDPDGYYV  
GWFFDVWGAGTTVT

VS

>1254VH (Seq. no. 46)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAYSTYDMSWVRQTPEK  
RLEWVAYISSGGDAA

YYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCARSRYGNY

GDAMDYWGQGTSVT

VS

>1257VH (Seq. no. 47)

RAEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFTDYNMAWVKQSHGKS  
LEWIGDIIPNNGGA

IYNQKFKGKATLTVDKSSSTASMELRSLTSEDTAVYFCARKNIYYRYD  
GAGALDYWGQGT

SVTVS

>1260VH (Seq. no. 48)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQPPGKG  
LEWLGVIWAGGSTN

YNSALMSRLSIKKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYCARAYGYNFD  
YWGQGTTLTVS

>1261VH (Seq. no. 49)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYVMSWVRQTPEKR  
LEWVATITSGGRNI

YYLDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYCARHEDYRY  
DGYYAMDYWGQGTS

VTVS

>1277VH (Seq. no. 50)

RAEVQLVESGGGLVKPGESLKLSACAASGFAFSYSMDMSWVRQTPEKR  
LEWVAYMSSAGDVT

FYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQVSSLKSEDTAIYYCVRHRDVAMD  
YWGQGTTSVTVS

>1284VH (Seq. no. 51)

RAQVQLQQPGAEVLVKPGASVKLSCKASGYTFTSDWMHWMKQRPG  
QGLEWIGEINPSNGRS

SYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARIGGIYVET  
YWGQGTIVTVS

>1308VH (Seq. no. 52)

RAEVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVRQRPGQ  
GLEWIGQIYPGDGDT  
NYNGKFKGRATLTANKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRASSLYD  
VYPYYFDYWGQGT

TLTVS

>1320VH (Seq. no. 53)

RAQVQLQQPGAELVKPGASMKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPG  
QGLEWIGEINPSNGRT  
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSGVYYCAKGGNYYD  
YDWDYWGQGTTLTVS

>1344VH (Seq. no. 54)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGL  
EWLGVIWAGGNTN  
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYFCARGYGYNLD  
YWGQGTTLTVS

>1347VH (Seq. no. 55)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTVSGFSLTGHNWVRQPPGKG  
LEWLGMIWGDGSTD  
YNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARGYGYLYYF  
DYWGQGTTLTVS

>992VL (Seq. no. 56)

ctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctggagacagagtcacc  
atca  
gttgcaggacaagtgcaggacattggcaattttaaactggtatcagcagaaaccagatggaact  
gttaa  
actcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaagggtcagtggcagtgggtct  
gga  
acagattttctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgtgccacttactttgccaacactat  
a

atacggttcctccgacgttcggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcacc  
atctgt  
cttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctgaataa  
c  
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactccc  
aggaga  
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaagcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccatcagggcctgagctgcggcgtcac  
aaagagc  
ttcaacaggggagagtgt  
>1024VL (Seq. no. 57)  
ctagccgacatcgatgacacaagctgcattctccaaatccagtcaacttggaaacatcagcttcca  
tct  
cctgcaggtcttagtaagagtctcctacatagtaatggcatcaatttttatggtatctgcagaagc  
c  
aggccagtctcctcagctccgtattatcagatgtccaaacctgcctcaggagtcccagacaggttc  
agt  
agcagtgggtcaggaactgattcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtggtg  
tttatt  
actgtgctaaaaatctagaacttccgtacacgttcggagggggaccaagctggaaataaaacg  
aactgt  
ggctgcaccatctgtttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgt  
g  
tgcctgctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctcca  
atcg  
gtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcag  
caccctgac  
gctgagcaaagcagactacgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccatcagggcc  
tgagctcg

cccgtcacaaagagctcaacagggagagtgt  
>1030VL (Seq. no. 58)  
ctagccgacattgtgctgactcagtcctgccttagcttatctctggggcagagggccaccat  
tt  
catgcagggccagcaaaagtgtcagtacatctggctatagtttatgcactggtaactgaaac  
cagg  
acagccacccaaactcctcatctatcttgcattccaaacctagaatctgggtccctgccaggttcagt  
ggc  
agtgggtctggcacagacttcaccctcaacatccatcctgtgaaagaggaggatgctcaaccta  
ttact  
gtcagcacagtagggagttccgttaacgttcggaggggggaccaagctgaaataaaacgaa  
ctgtggc  
tgtcaccatctgttcatcttccgcacatctgatgagcagttgaaatctgaaactgcctctgtgtgc  
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatc  
ggta  
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcac  
cctgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctga  
gctgccc  
gtcacaaagagactcaacagggagagtgt  
>1042VL (Seq. no. 59)  
gatattgtatgactcaggctgcatttccaaatccaggactcttggaaacatcagttccatctcctgc  
a  
ggtagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttattgtattggatctgcagaagccaggc  
ca  
gtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaaccttgcctcaggagtcggcagacaggttcagtc  
agt  
gggtcaagaactgattcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtttattac  
tgtg  
ctaaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctgaaataaaacgaactgt

ggctgc  
accatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgcctg  
ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcg  
gtaact  
cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccct  
gacgctgag  
caaagcagactacgagaacacaaaactctacgcctgcgaagtaccatcagggcctgagct  
cgcccgtc  
acaagagacttcaacagggagagtgt  
>1208VL (Seq. no. 60)  
ctagccgatgttgtatgactcagactccactctccctgcctgtcagtctggagatcaagcctccat  
ct  
cttgcatcttagtcagagcctgtacacagtaatggaaacacacctattacattggtacctgcagaa  
gcc  
aggccagtctccaaaactcctgatctacaaagttccaaccgatttctgggtcccagacaggttc  
agt  
ggcagtggatcagggacagattcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctggga  
gtttatt  
tctgctctcaaagtacacatgtccccacgttcggagggggaccaagctggaaatcaaacgaact  
gtggc  
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgc  
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatc  
gggta  
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcac  
cctgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaacacaaaactctacgcctgcgaagtaccatcagggcctga  
gctcgccc  
gtcacaaagagacttcaacagggagagtgt  
>1229VL (Seq. no. 61)  
ctagccgacattgtatgacccagtctcacaaattcatgtccacatcagtggagacagggtcag

catca  
cctgcaaggccagtcaggatgtgactaatgccgtagccttgtatcaacaaaaaccaggacaatc  
tcctaa  
actactgatttactgggcatccatccgacacactggagtcctgatcgcttcacaggcagtagatct  
ggg  
acagattatacttcaccatcaaacagtgtgcaggctgaagacacctggccttattattgtcagcaac  
att  
ataacactccgctcacgttcggtgctggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcacc  
atctgt  
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctgaataa  
c  
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactccc  
aggaga  
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaaggcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcggcgtcac  
aaagagc  
ttcaacagggagagtgt  
>1254VL (Seq. no. 62)  
ctagccgatttgtatgacacagactccactctccctgcctgtcagtctggagatcaagcctccat  
ct  
cttcagatcttagtcagagcctgtacacagtaatggtaacacctattacattggacacatgcagaa  
gcc  
aggccagtctccaaagctcctgcttacaaagttccaaccgatttctggggccagacaggttc  
agt  
ggcagtggatcagggacagattcacactcaagatcagcagagtggagttctgaggatctggga  
gtttatt  
tctgctctaaaatacacatgtgtacacgttcggaggggggacaaagtggaaataaaacgaact  
gtggc  
tgcaccatctgttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgc

ctgctgaataacttatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatc  
ggta  
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcctcagcagcac  
cctgacgct  
gagcaaaggcagactacgagaaacacaaaacttacgcctgcgaagtaccatcagggcctga  
gctcgccc  
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt  
>1257VL (Seq. no. 63)  
ctagcccaaatttgctcacacagtctccagcaatcatgtctgcacatccagggagaaggtcac  
catga  
cctgcagtgccagctcaagtgtaaattttactggtaccagcagaagccaggatcctcccc  
agact  
cctgatttatgacgcattccaaacctggcttctggagtccctgttcgcattcagtggcagtggctggga  
cc  
tcttactcttcacaatcagccaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtgg  
gca  
gttacccaatcacgttcggctcgggacaaagtggaaataaaacgaactgtggctgcaccatct  
gtctt  
catctccgcacatgtgatgagcagttgaaatctggactgcctctgtgtgcctgctgaataactt  
c  
tatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactcccag  
gagagtg  
tcacagagcaggacagcaaggacacgcacccatcagcctcagcagcaccctgacgctgagcaa  
agcagacta  
cgagaaacacaaaacttacgcctgcgaagtaccatcagggcctgagctgcccgtacaaa  
gagcttc  
aacaggggagagtgt  
>1260VL (Seq. no. 64)  
ctagccgatatccagatgactcagactacatcctccctgtgcctctggagacagagtcacc  
atca

gttcagtgcaagtgcaggcattaccaattattaaactggtatcagcagaaaccagatggaactgt  
taa  
actcctgatctattactcatcaagttacactcaggagtccatcaaggttcagtggcagtgggtctgg  
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagta  
ta  
gtgagattccgtacacggtcgaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcac  
catctgt  
cttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgcctgctgaataa  
c  
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactccc  
aggaga  
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaagcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcggccgtcac  
aaagagc  
ttcaacagggagagtgt  
>1261VL (Seq. no. 65)  
ctagcccaaattgtgctgacccagttccagcaatcatgtctgcacatccagggagaaggtcac  
cataa  
cctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatgcactggccagcagaagccaggacttctccc  
aaact  
ctggatttagtatcatccaacctggctctggagtcctgcgttcagttggcagtggatctggga  
cc  
tcttactcttcacaatcagccaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcaaagg  
agta  
gttacccatacagttcgaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatc  
tgtctt  
catctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgcctgctgaataactt  
c

tatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactcccag  
gagagt  
tcacagagcaggcacagaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaa  
agcagacta  
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccatcagggcctgagctgcggcgtacaaa  
gagcttc  
aacaggggagagtgt  
>1277VL (Seq. no. 66)  
ctagccgatttgtatgacccagactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccat  
ct  
cttgcagatctagttagcagacgcctgtacacagtaatggaaacaccattacattggtagctgcagaa  
gcc  
aggccagtctccaaagctccctgatctacaagttccaaaccgatttctggggtcccagacaggttc  
agt  
ggcagtggatcagggacagattcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctggga  
gtttatt  
tctgcctcaaagtacacatgtccgacgttcggtagcggaccaagctggaaatcaaacgaact  
gtggc  
tgcccatctgtttcatctccccccatctgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgtgc  
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatc  
ggta  
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcac  
cctgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccatcagggcctga  
gctgccc  
gtcacaaagagcttcaacagggagagtgt  
>1284VL (Seq. no. 67)  
ctagccgacattgtctaacaacacagtctccctgccttagctgtatctctggggcagaggccacca  
tct  
catgcagggccagccaaagtgtcagtacatctacctatagttatgcactggtatcaacagaaat

cagg  
acagccacccaaactcctcatcaagtatgcatccaaccttagagtcgggtccctgccaggta  
gtggc  
agtgggtctggacagacttcaccctaacaatccatcctgtggaggaggatactgcaacat  
attact  
gtcagcacagttggagattccgtggacgttcggaggccaaagctgaaatcaaacgaa  
ctgtggc  
tgcaccatctgttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctcttgtgc  
ctgctgaataacttatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatc  
gggta  
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcac  
cctgacgct  
gagcaaagcagactacgagaaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctga  
gctcgccc  
gtcacaaagagacttcaacagggagagtgt  
>1308VL (Seq. no. 68)  
ctagccgacatccagatgacacaaaactacatccctgtctgcctctggagacagagtcac  
catca  
gttcagggcaagtcaaggcatttcaattttaaacttgtatcagcagaaaccagatggaaact  
gttaa  
agtccgtatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtggct  
gga  
acagattattcttcaccatttcaacctggagcaagaagatattgccactttgccaacagg  
gta  
atacgctccgtacacgttggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcac  
catctgt  
cttcacatcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctgaataa  
c  
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactccc  
aggaga

gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaagcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcggcgtcac  
aaagagc  
ttcaacaggggagagtgt  
>1320VL (Seq. no. 69)  
ctagccgacattcagatgacccagactacatcctccctgtctgcctctggagacagagtcacc  
atca  
gttgcagtgcaagtcaaggacattagcaattattaaactggtatcagcagaaaccagatggaact  
gttaa  
actcctgatctatcacacatcaactttacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtct  
ggg  
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcaata  
ta  
gtaagcttccgtggacggtcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcacc  
atctgt  
cttcatcttcccgcctgtatgagcagttgaaatcttggactgcctctgtgtgcctgctgaataa  
c  
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaactgcctccatcggtaactccc  
aggaga  
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaagcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcggcgtcac  
aaagagc  
ttcaacaggggagagtgt  
>1344VL (Seq. no. 70)  
ctagccgacattcagatgacacagactacttcctccctgtctgcctctggagacagagtcacc  
atta  
gttgcagtgcaagtcaaggcattagtaattattaaactggtatcagcagaaaccagatggaactg  
ttaa

actcctgatctattacacatcaagttacactcaggagtcccatcaagggtcagtggcagtggctg  
gg  
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcaga  
ta  
gtaagctccgtacacggtcgaggggggaccaagctggaaatcaaacaactgtggctgcac  
catctgt  
cttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctgaataa  
c  
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcggtaactccc  
aggaga  
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgctgag  
caaagcaga  
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcttagctcgccccgtcac  
aaagagc  
ttcaacaggggagagtgt  
>1347VL (Seq. no. 71)  
ctagccaaaaatgtgctgactcagtctccagcaatcatgtctgcacatccagggaaaaggtcac  
catga  
cctgcagggccagctcaagtgtaaagtccagttactgcactggtaccagcaaaagttagtgct  
cccc  
caaactctggatttagcacatccaacttggctctggagtcgcctcgcttcagtggcagtgggt  
ct  
gggaccttactctcacagtcaacagtgtggagactgaagatgctgccacttattactgccacc  
agt  
acagtggttcccattcacgttcggctcgggaccaagctggagactgaaacgaactgtggctgca  
ccatc  
tgtcttcattttccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctgctgaat  
aacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctccaatcggtaact  
cccagg  
agagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacgct

gagcaaagc

agactacgagaaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccatcagggcctgagctcgccgt  
cacaaag

agcttcaacaggggagagtgt

>992VL (Seq. no. 72)

LADIQMTQTSSLASLGDRTVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVK  
LLIYYTSRLHSGV

PSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLE  
IKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1024VL (Seq. no. 73)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPG  
QSPQLLIYQMSN

LASGPVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGG  
GTKLEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDSTY

SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1030VL (Seq. no. 74)

LADIVLTQSPASLAVALGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQLKPG  
QPPKLLIYLASN

ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGG  
GTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYS

LSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1042VL (Seq. no. 75)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQS

PQLLIYQMSNLA  
SGVPDRFSSSGSRTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGT  
KLEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDSTYSL  
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1208VL (Seq. no. 76)  
LADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSSQLVHSNGNTYLHWYLQKP  
GQSPKLLIYKVSN  
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGG  
GTKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1229VL (Seq. no. 77)  
LADIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIITCKASQDVTVNAVAWYQQKPGQSP  
KLLIYWASIRHTGV  
PDRFTGSRSGTDYTLTINSVQAEDLALYYCQQHYNTPLTFGAGTKLEI  
KRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYSLSSST  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1254VL (Seq. no. 78)  
LADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSSQLVHSNGNTYLHWYLQKP  
GQSPKLLLYKVSN  
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVESED LGVYFCSQNTHVYTFGG  
GTKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1257VL (Seq. no. 79)

LAQIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQKPGSSPR  
LIYDASNLASGVP  
VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPITFGSGTKLEI  
KRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSTYSLSSTL

TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1260VL (Seq. no. 80)

LADIQMTQTSSLASLGDRVTISCSASQGITNYLNWYQQKPDGTVK  
LLIYYSSSLHSGV  
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSEIPYTFGGGTKLEI  
KRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1261VL (Seq. no. 81)

LAQIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFFQQKPGTSPKL  
WIYSTSNLASGVP

ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGTKEI  
KRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSTYSLSSTL

TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1277VL (Seq. no. 82)

LADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQLVHSNGNTYLHWYLQKP  
GQSPKLLIYKVSN

RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGG  
GTKLEIKRTVAAPS

VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ

ESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1284VL (Seq. no. 83)  
LADIVLTQSPASLAVALGQRATISCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKSG  
QPPKLLIKYASNL  
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPWTFGG  
GTKLEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1308VL (Seq. no. 84)  
LADIQMTQTSSLASALGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVK  
VLIYYTSRLHSGV  
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEI  
KRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYSLSS  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1320VL (Seq. no. 85)  
LADIQMTQTSSLASALGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVK  
LLIYHTSTLHSGV  
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPWTFGGGTKLEI  
KRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYSLSS  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1344VL (Seq. no. 86)  
LADIQMTQTSSLASALGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVK  
LLIYYTSSLHSGV  
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKEI

KRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYSLSST  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
>1347VL (Seq. no. 87)  
LAENVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCRASSVSSSYLHWYQQKSGAS  
PKLWIYSTSNLASG  
VPARFSGSGSGTSYSLTVNSVETEDAATYYCHQYSGFPFTFGSGTK  
LELKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
TEQDSKDSTYSLSS  
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
Apêndice 2, Sequencias da região constante de anticorpo  
>Região IGKC humana (Seq. no. 88)  
ttcatctccgcccacatctgatgagcagtgaaatctggactgcctctgtgtgcctgctgaataact  
tctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactccca  
ggagag  
tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagc  
aaagcagac  
tacgagaaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtaccatcagggcctgagctgccgtcaca  
aagagct  
tcaacagggagagtgttaataagcggccgcccgtggaggcggt  
> Região IGKC humana (Seq. no. 89)  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDS  
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
Exon1 1..298  
Intron 299..689  
Exon2 690..734  
Intron 735..852

Exon3 853..1182

Intron 1183..1279

Exon4 1280..1602

>sequência genômica do domínio constante de IGHG1 humana (Seq. no. 90)

agtgcctccaccaagggcccattcggtttccccctggcaccctccaaagagcacctctggggg  
cacag

cggccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccggtagcggtgctggaactcagg  
cgccct

gaccagcggcgtgcacaccccccgtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgt  
ggtg

accgtgccctccaggcagttgggcacccagacctacatctgcaacgtaatcacaagcccagc  
aacacca

aggtggacaagagagttggtagaggccagcacagggagggagggtgtctgctggaagcca  
ggctcagcg

ctcctgcctggacgcattccggctatgcagtccctcaggcagcaaggcaggccccgtctg  
cctctt

caccggaggcctgtccgcggccactcatgctcaggagagggtcttggctttccccaggg  
tctg

ggcaggcacaggctagggtccccataaccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgggct  
cagacctg

ccaagagccatatccgggaggaccctgccccgtacctaagcccacccaaaggccaaactctc  
cactccc

tcaagtcggacaccctctcctccagattccagtaactccaaatctctctgcagagccaaat  
ct

tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccaggtaagccagccaggcctgcggccctccagct  
caaggc

gggacaggtagacttagcctgcattccaggacaggccccagccgggtgctgacacgtc  
cacctcca

tcttcctcagcacctgaactcctgggggaccgtcagtttccctttcccccaaaacccaagga

cac  
cctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtgacgtgagccacgaagaccct  
gaggtc  
aagtcaactggtacggtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaagccgcggagga  
gcagtaca  
acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcaccgtcctgcaccaggactggctaatggcaagga  
gtacaa  
gtgcaaggctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaag  
gtgggacc  
cgtgggtgcgagggccacatggacagagggccggctggcccaccctctgccctgagagtga  
ccgctgta  
ccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgg  
gaggaga  
tgaccaagaaccaggtagcgcctgacctgcctggtaaaggcttatccagcgacatgcgcgtg  
gagtg  
ggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgac  
ggctcccttc  
ttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaaacgtttctcatgctc  
cgtga  
tgcattaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccgtccccggtaatga  
>IGHG1 (Seq. no. 91)  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
TSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVT  
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  
LGGPSVFLPPKPKDTLMISRTP  
EVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPGK

Apêndice 3. Sequencias de anticorpo de domínio variável duplo

>992L1024\IGHV (Seq. no. 92)

ggcgcgccgaggccaactgcagcaacctggtctgagctggtaggcctggagctcagtcaa  
gctgtc

ctgcaaggctctggctacacattcaccagctactggatgcactggtaagcagaggcctggac  
aaggc

cttgagtggattggaaatatttatcctggtagtcgtactaactacgatgagaagtcaagagca  
agg

ccacactgacttagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctga  
ggactc

tgcggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcgggatgctatggactactgg  
ggt

caaggaacctcagtcaccgtctcgtagccagcaccaaggcccccaggtccaactgcagca  
gcctgggg

ctgaactggtgagcctggggttcagtgaagctgcctgcaaggctctggctacaccctcacca  
gtca

ctggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggataggtgagattaatcct  
agcagc

ggtcgtaataactacaatgagaagtcaagagtaaggccacactgacttagacaatcctcca  
gcacag

cctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctgcggctatttgtaagatactatgg  
a

cgacgaagctatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcgag

>992L1024\IGKV (Seq. no. 93)

gctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctggagacagagtcac  
catc

agttcaggacaagtcaaggacattggcaattttaaactggtatcagcagaaaaccagatggaa  
ctgtta

aactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtccatcaaggttcagtggcagtgggt

ctgg  
aacagatttctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgtgccactactttccaaact  
at  
aatacggttccctccgacgttcggtgaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcac  
cagaca  
tcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcaacttggAACATCAGCTCCATCTCCTGCAGG  
tc  
tagtaagagtctcctacatagtaatggcatcaTTTGTATTGGTATCTGCAGAAGGCCAGGCCAGT  
ct  
cctcagctcctgatttacagatgtccaaccctgcctcaggagtcccagacaggttcagtagcagt  
gg  
caggaactgattcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgttattactgt  
ctca  
aaatctagaactccgtacacgttcggagggggaccaccaagctggaaataaaacgaactgtggct  
gcacca  
tctgtcttcattccccccatctgtatgagcagttgaaatctggAACTGCCTCTGTTGTCCTGCTGA  
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggtta  
ctccca  
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcaccctgacg  
ctgagcaaa  
gcagactacgagaaacacacaaagtctacgcctgcgaagtccaccatcaggcctgagctgc  
gtcacaa  
agagctcaacagggagagtgttaataagcggccgc  
>1024L992\IGHV (Seq. no. 94)  
ggcgcgcccaggccaactgcagcagcctgggctgaactggggctggagcctgggggtcagtga  
agctgtc  
ctgcaaggctctggctacaccctcaccagtcaactggatgcactgggtgaagcagaggcctggac  
aaggc  
cttgagtggttaggtgagattaatcctagcagcggtcgtataactacaatgagaagtcaagat  
aagg

ccacactgactgttagacaaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatcttag  
gactc  
tgcggtcttatttgttaagatactatggttacgacgaagctatggactactgggtcaaggaacc  
tca  
gtcaccgtctcgtcagccagcaccaaggccccgaggccaactgcagcaacctgggtctgag  
ctggtga  
ggcctggagcttcagtgaagctgtcctgcaaggctctggctacacattcaccagctactggatgc  
actg  
ggtaaggcagaggcctggacaaggcctgagtggattggaaatatttatcctggtagtcgttagtac  
taac  
tacgatgagaagttcaagagcaaggccacactgacttagacacatcctccagcacagcctac  
atgcagc  
tcagcagcctgacatctgaggactctcggtcttattactgtacaagaaatggggattactacgttag  
tag  
cggggatgctatggactactgggtcaaggaacacctcagtcaccgtctcgag  
>1024L992\IGKV (Seq. no. 95)  
gctagccgacatcgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggAACATCAGCTCC  
atc  
tccgcaggcttagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttattgtattggtatctgcagaag  
c  
caggccagtctcctcagctcctgatttacatgcattgtccaaacctgcctcaggagtcccagacaggtt  
cag  
tagcagtgggtcaggaactgattcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggt  
gtttat  
tactgtgctaaaaatctagaactccgtacacgttcggagggggaccaagctggaaataaaac  
gaactg  
tggctgcaccagacattcagatgactcagactacatcctccctgtcgcctctggagacagag  
tcac  
catcagttgcaggacaagtcaggacattggcaattattaaactggtagtcagcagaaaccagatg  
gaact

gttaaactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaagggttcagtggcagtgg  
 ctggaacagattttctctaccattaacaacgtggagcaagaggatgtgccacttactttgccaaca  
 ctataatacggtcctccgacgttcggtgaggcaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcacca  
 tctgtcttcatctccgcccattctgatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgtgcctgctgaa  
 ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactccca  
 ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacacgcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa  
 gcagactacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtccccatcagggcctgagctgcggcc  
 gtcacaa  
 agagctcaacagggagagtgttaataaagcggccgc  
 >992L1024\IGHV (Seq. no. 96)  
 RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQ  
 GLEWIGNIYPGSRST  
 NYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVS  
 SGDAMDYWGQGTS  
 VTVSSASTKGPQVQLQQPGAELEVPGGSVKLSCKASGYTFTSHWM  
 HWVKQRPGQGLEWIG  
 EINPSSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYC  
 VRYYGYDEAMDYWGQGTSVTVS  
 >992L1024\IGKV (Seq. no. 97)  
 LADIQMTQTSSLASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVK  
 LLIYYTSRLHSGV  
 PSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLE  
 IKRTVAAPDIVMT  
 QAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLI  
 YQMSNLASGVPD

RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTLEIK  
RTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYSLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC  
>1024L992\IGHV (Seq. no. 98)  
RAQVQLQQPGAELEVPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPG  
QGLEWIGEINPSSGRN  
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDEA  
MDYWQGQGTSVTVS  
SASTKGPEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVK  
QRPGQGLEWIGNIYP  
GSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNG  
DYYVSSGDAMDYWGQGTSVTVS  
>1024L992\IGKV (Seq. no. 99)  
LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPG  
QSPQLLIYQMSN  
LASGPVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGG  
GTKLEIKRTVAAP  
DIQMTQTTSSLASALGDRVTCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLI  
YYTSRLHSGVPS  
RFSGSGSGTDFLSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIK  
RTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYSLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição de anticorpo para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo que tenha sido submetido a um regime de tratamento anterior envolvendo um anticorpo anti-EGFR humano, a dita composição caracterizada pelo fato de que compreende:

um primeiro anticorpo anti-EGFR humano ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo e um segundo anticorpo anti-EGFR humano ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo distinta do primeiro anticorpo ou porção de ligação ao antígeno, em que:

a) as CDR1, CDR2 e CDR3 das cadeias leve e pesada do primeiro anticorpo anti-EGFR humano compreendem os resíduos 29 - 34, 52-55 e 92-96 da SEQ ID NO: 72 e resíduos 28-35, 53-60 e 99-114 da SEQ ID NO: 40, respectivamente; e

b) as CDR1, CDR2, e CDR3 das cadeias leve e pesada do segundo anticorpo anti-EGFR humano compreendem os resíduos 29- 39, 57-59, e 96-104 da SEQ ID NO: 73 e resíduos 28-35, 53- 60 e 99- 110 de SEQ ID NO: 41, respectivamente.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que:

a) o referido primeiro anticorpo anti-EGFR humano compreende a sequência de aminoácidos de VL em SEQ ID NO: 72 e a sequência de aminoácidos VH em SEQ ID NO: 40; e

b) o referido segundo anticorpo anti-EGFR humano compreende a sequência de aminoácidos de VL em SEQ ID NO: 73 e a sequência de aminoácidos de VH em SEQ ID NO: 41.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o primeiro e o segundo anticorpos anti-EGFR humano são do subtipo de isotipo IgG1 ou IgG2.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que:

a) o primeiro anticorpo anti-EGFR humano apresenta uma cadeia leve compreendendo os aminoácidos 3-216 da SEQ ID NO: 72, e uma cadeia pesada compreendendo:

(i) um domínio variável da cadeia pesada que compreende os aminoácidos 3-124 da SEQ ID NO: 40, e

(ii) a sequência de aminoácidos do domínio constante em SEQ ID NO: 91; e

b) o segundo anticorpo anti-EGFR humano apresenta uma cadeia leve que compreende os aminoácidos 3-221 da SEQ ID NO: 73, e uma cadeia pesada compreendendo:

(i) um domínio variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos 3-120 da SEQ ID NO: 41, e

(ii) a sequência de aminoácidos do domínio constante na SEQ ID NO: 9.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a proporção do primeiro anticorpo ou porção de ligação ao antígeno em relação ao segundo anticorpo ou porção de ligação ao antígeno é de 1: 1.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o primeiro e o segundo anticorpos anti-EGFR humano ou porções de ligação ao antígeno da referida composição não inibem a ligação um do outro ao EGFR humano.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que um ou ambos os anticorpos ou porções de ligação ao antígeno da referida composição são capazes de aumentar a capacidade máxima de ligação do outro anticorpo ou porção de ligação ao antígeno em relação ao EGFR humano.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a composição não contém mais anticorpos ou porções de ligação ao antígeno além do primeiro e segundo anticorpos ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o referido câncer é resistente ou parcialmente resistente ao tratamento com um anticorpo selecionado do grupo que consiste em cetuximabe, panitumumabe, zalutumumabe, nimotuzumabe, ICR62, mAb806, matuzumabe e anticorpos capazes de ligando o mesmo epítopo como qualquer um destes.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o referido câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de cabeça e pescoço, câncer de cólon, câncer de mama, câncer renal, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata, glioma, câncer pancreático, câncer de bexiga, carcinoma de células não pequenas do pulmão (NSCLC), câncer gástrico, câncer cervical, câncer hepatocelular, câncer gastroesofágico, câncer colorretal, câncer retal, carcinoma epitelioide, RCC, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (SCCHN), câncer de esôfago, glioblastoma multiforme, carcinoma de células escamosas, câncer de rim, sarcoma e melanoma.

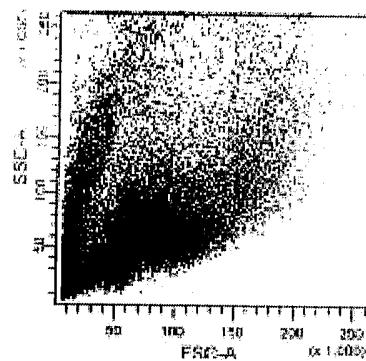
11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o câncer é carcinoma de células não pequenas do pulmão (NSCLC), carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (SCCHN) ou câncer colorretal.

12. Composição, de acordo com qualquer uma das

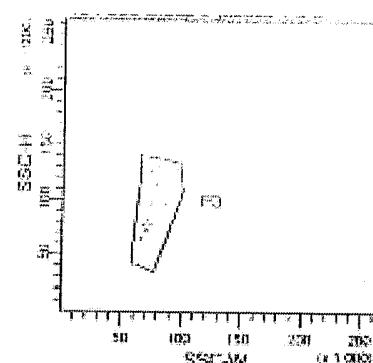
reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o referido câncer é resistente ou parcialmente resistente ao referido regime de tratamento anterior.

13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que o indivíduo é humano.

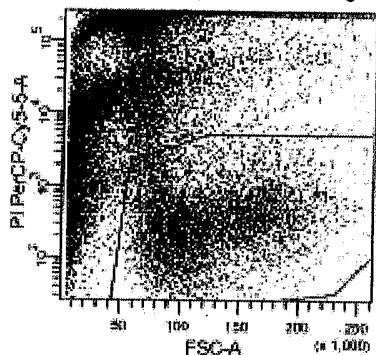
134-005 Grupo 2 Camundongo 4-5-6



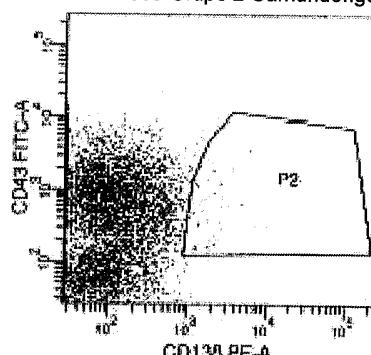
134-005 Grupo 2 Camundongo 4-5-6



134-005 Grupo 2 Camundongo 4-5-6



134-005 Grupo 2 Camundongo 4-5-6



Tubo: Mouse 4-5-6

## População



	#Events	%Parental	%Total
Eventos	30,000	100.0	
P1	7,650	25.5	25.5
P2	71	0.9	0.2
P3	60	84.5	0.2

FIG. 1

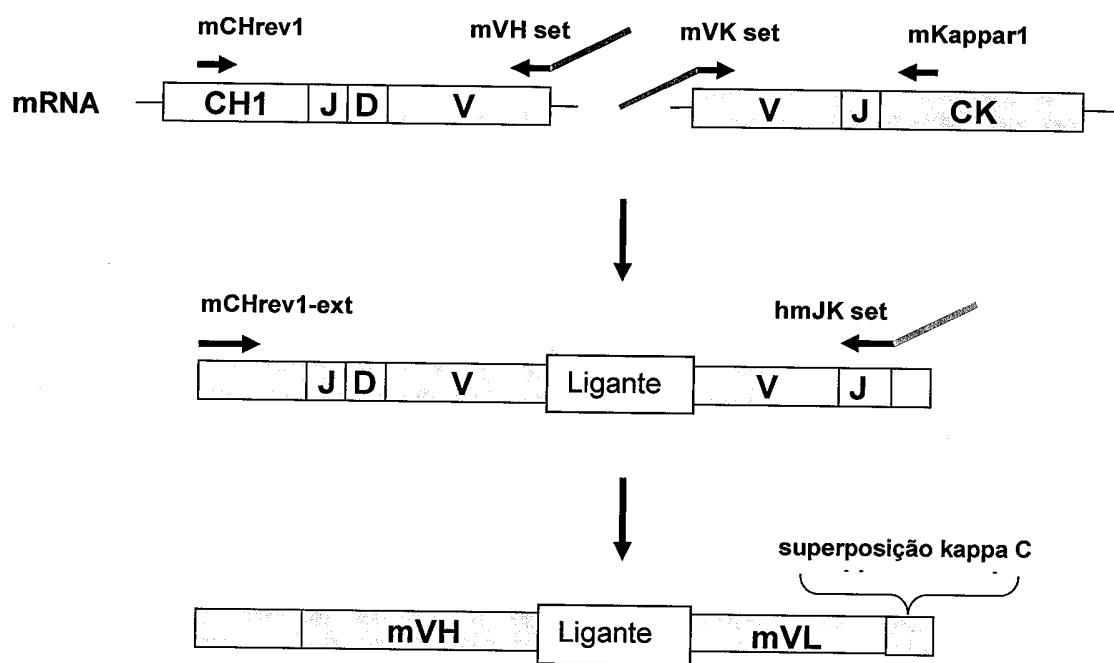


FIG. 2

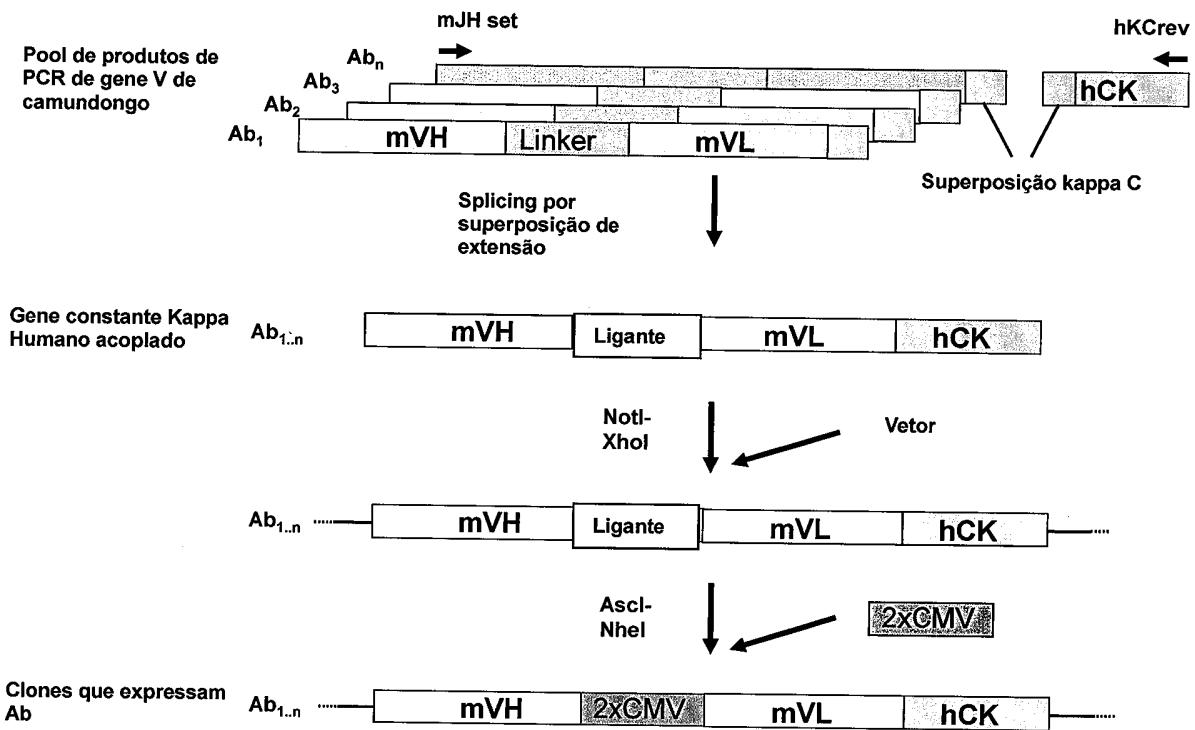


FIG. 3

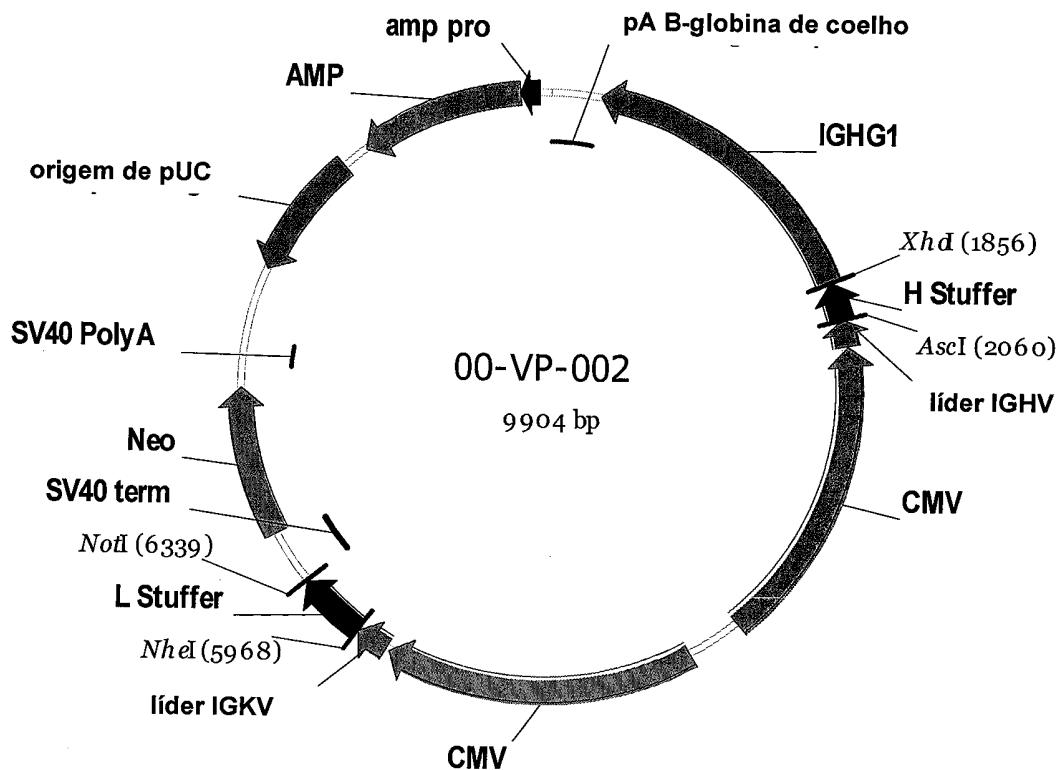


FIG. 4

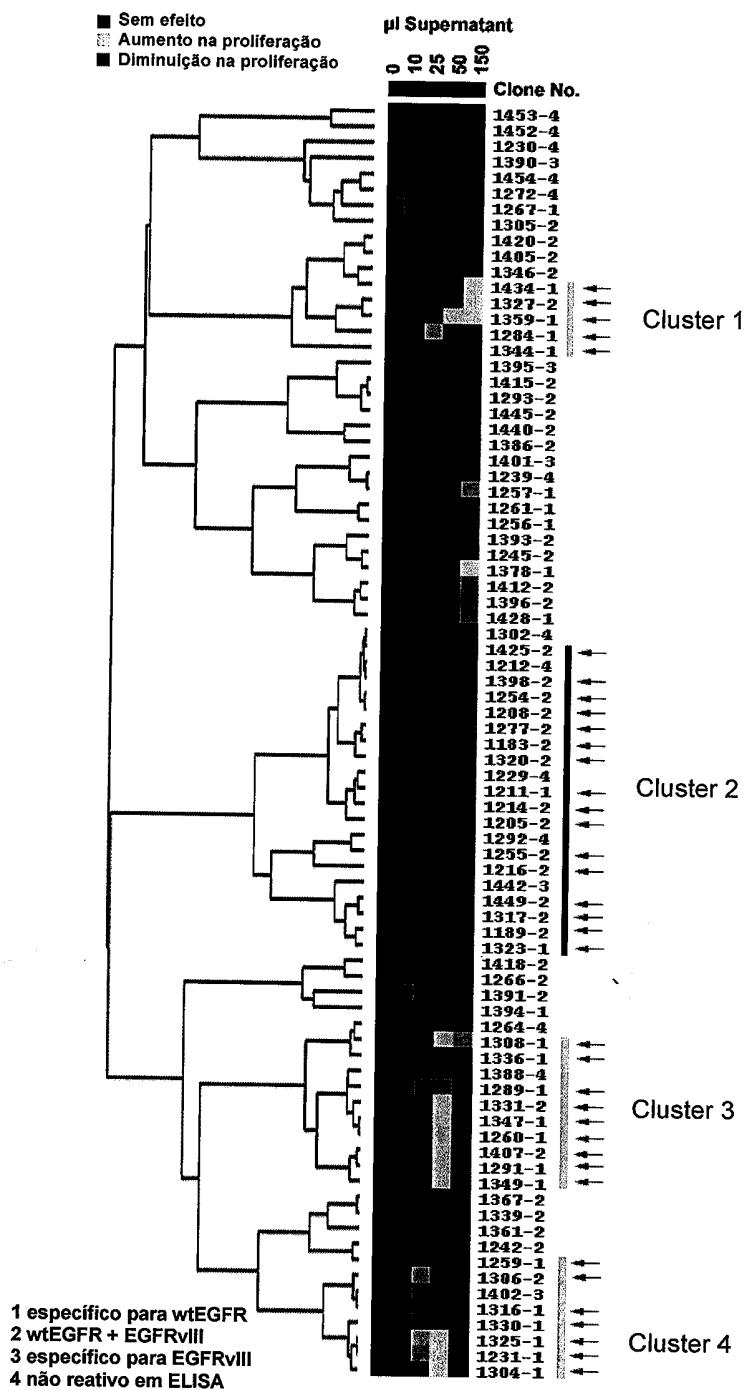


FIG. 5

Clone	I		II		III			
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2	
992	-20	-2	-21	-3	-14	78	77	
<b>1024</b>	11	18	11	12	27	3	75	
1030	12	-20	-35	92	92	91	-1	
1042	-7	7	-29	-7	15	24	81	
<b>1208</b>	-21	-3	-10	84	89	82	20	
1229								
1257	78	92	77	25	33	6	37	
1260	90	92	12	17	24	12	8	
1261	57	88	30	6	13	3	6	
1277	32	28	8	77	85	61	20	
1284	88	52	9	31	30	12	26	
<b>1308</b>	71	91	19	0	12	4	11	
1320	2	8	0	6	7	9	-9	
<b>1344</b>	82	82	40	28	36	19	14	
<b>1428</b>	91	94	34	11	17	18	14	
<b>Erbitux</b>	-17	4	-4	21	-73	78	69	
<b>Erbitux</b>	-22	2	-5	22	-81	78	68	
<b>Vectibix</b>	-30	-12	-24	6	57	60	42	
<b>Vectibix</b>	-13	-1	-6	16	64	68	46	

FIG. 6A

Clone	I		II		III			Epítopo Especificidade
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2	
992						+++	+++	Domínio III
<b>1024</b>					+		+++	Domínio III
1030				+++	+++	+++		Domínio III
1042							+++	Domínio III
<b>1208</b>				+++	+++	+++		Domínio III
1229								Desconhecido
1257	+++	+++	+++	+	+		+	Domínio I / I
1260	+++							Domínio I
1261	+++		+					Domínio I
1277	+	+		+++	+++	++		Domínio III
1284	+++	++		+	+		+	Domínio I
<b>1308</b>	++							Domínio I
1320								Desconhecido
<b>1344</b>	+++	+++	+	+	+			Domínio I
<b>1428</b>	+++	+++	+					Domínio I
<b>Erbitux</b>						+++	+++	Domínio III
<b>Erbitux</b>						+++	+++	Domínio III
<b>Vectibix</b>							+	Domínio III
<b>Vectibix</b>							+	Domínio III

FIG. 6B

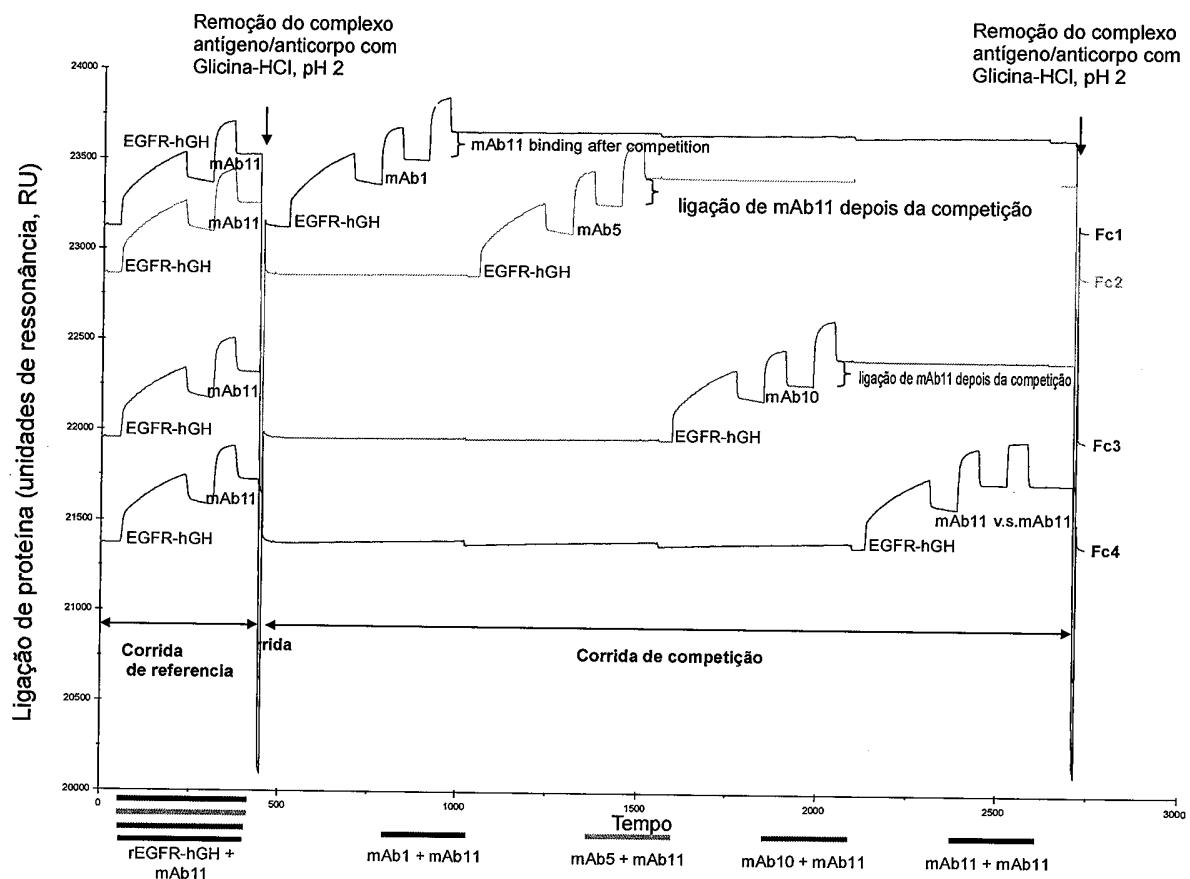


FIG. 7

Clone	I		II		III				
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Erbbitux	Vectibix	
992	-4	-3	7	1	-4	99	90	106	
1024	-3	-13	0	0	-5	6	104	102	
1030	54	-5	6	104	84	98	-1	16	
1042	-6	-8	0	10	-4	14	107	10	
1208	5	4	5	66	32	37	18	29	
1229*									
1257	22	100	85	-5	1	-1	0	-2	
1260	91	99	64	1	12	7	8	10	
1261	24	99	64	-3	-6	-4	-2	-5	
1277	5	3	10	85	62	81	60	86	
1284	86	-15	9	-13	-8	-9	-7	-13	
1308	15	85	11	-4	-3	-5	-6	-8	
1320	-3	-6	2	-3	-2	3	2	6	
1344	87	86	25	-3	0	-2	-4	-5	
1347	17	86	11	-1	-1	-3	-4	-6	
1428	77	88	42	0	1	0	2	0	
Erbbitux	-3	-3	0	29	0	101	94	104	
Vectibix	0	-4	5	0	0	88	79	102	

FIG. 8A

Clone	I		II		III					Epítopo Especificidade
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Erbbitux	Vectibix		
992										Domínio III
1024										Domínio III
1030										Domínio III
1042										Domínio III
1208						+	+		+	Domínio III
1229*										no binding
1257										Domínio I / II
1260										Domínio I / II
1261										Domínio I / II
1277										Domínio III
1284										Domínio I
1308										Domínio I
1320										Desconhecido
1344										Domínio I
1347										Domínio I
1428				+						Domínio I / II
Erbbitux					+					Domínio III
Vectibix										Domínio III

FIG. 8B

9/49

<b>Descontado</b>	<b>13.20</b>
	-1
	2
	8
	2
<b>15</b>	
<b>26</b>	
<b>-18</b>	
	<b>-38</b>
<b>4</b>	
	<b>30</b>
	<b>6</b>
	<b>7</b>
	<b>28</b>

III										VectBix		Eribitux	
992 corr	1024	1030corr	1042	1208	1254	1277	1449						
6	0	-5	-1	-2	-3	-3	-1	-2	-2	-7	-6	-7	-6
-9	3	2		1	0	7							
9	3	31		3	10	10							
7	4	2		0	0	6							
16	17	4	16	17	8	11	15	15	15	0	0	0	0
-10	33	19	31	33	22	25	29	31	31	8	8	8	8
14	-24	-6	-18	-24	-12	-18	-20	-21	-21	-2	-2	-2	-2
55	-13	21	1	5	-1								
-58	3	11	2	7	5								
-3	-1	89	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
25													
100	3	27	9	33	40	40	40	40	40	40	40	40	40
106	6	29	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
107	5	22	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
99	8	84	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
101	8	75	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
-27	193%	0	48	-3	3	0	355%	14	14	2	2	2	2

FIG. 9A

1257	1260	1261		
0	4	4		
27	-9	-9		
19	41	23		
16	-10	-13		
22	35	-27		
5	16	8		
9	4	13		
7	0	6		
8	4	10		
6	-1	12		
2	1	8		
2	-4	4		

Clone					
1284					
1344					
1347					
-					
	1257	1260	1261	992	1024
					1030
					1042
					1208
					1254
					1277
					1449
					Vectibix
					Eriblitux
					C 1320
	1 / #			#	

FIG. 9B

Clone				
1284				
1308				
1344				
1347				
	=			
1257				
1260				
1261				
mAB806				
	/	II		
992				
1024				
1030				
1042				
1208				
1254				
1277				
1449				
Vestiblik				
Eribitox				
	C			1320

10/49

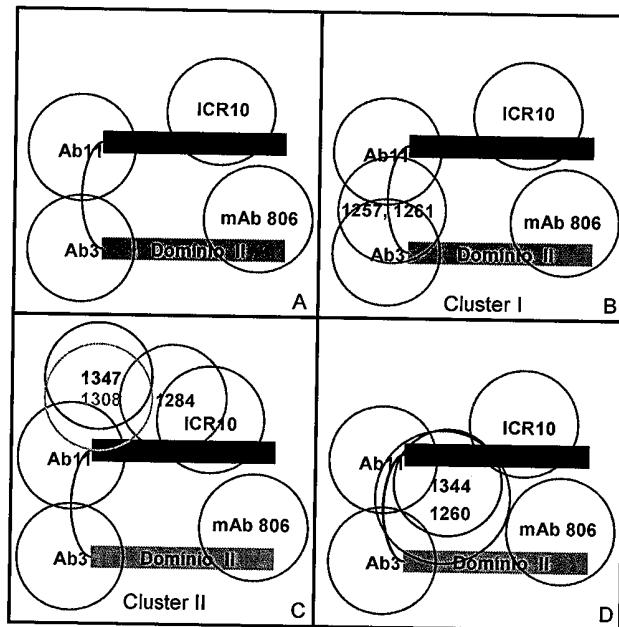


FIG. 10A

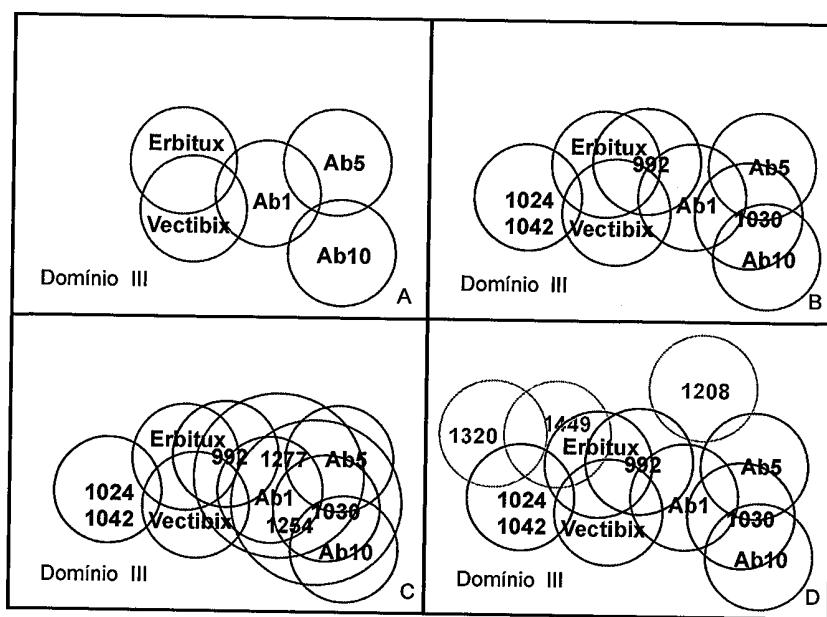


FIG. 10B

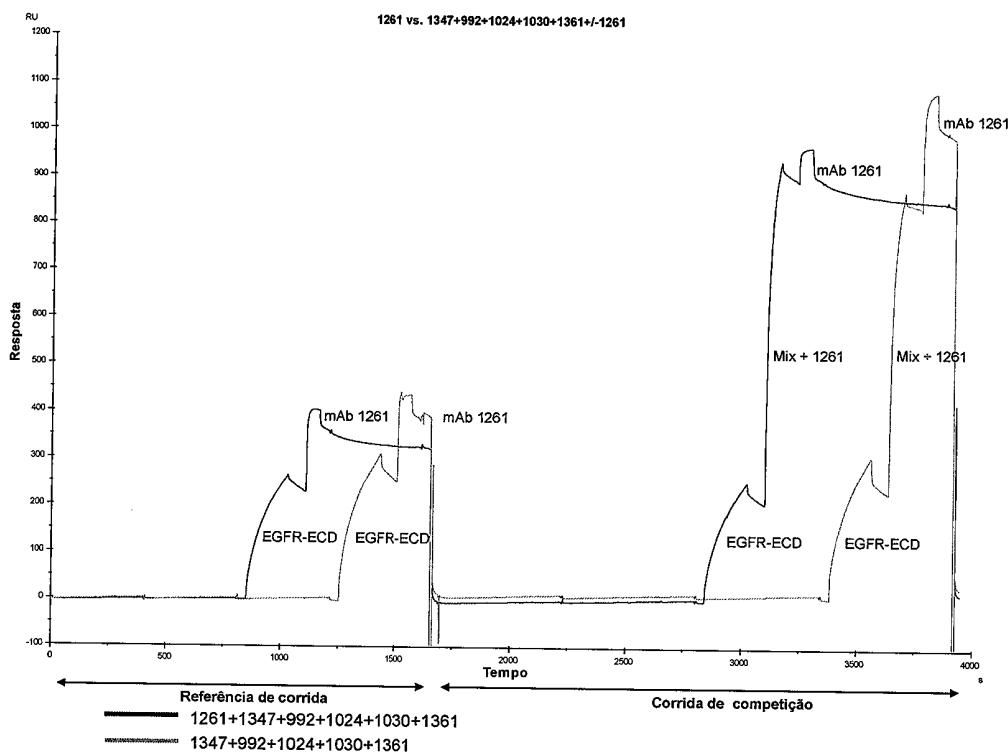
MAb de amostra	mAb Amostra de inibição	Rumax Ciclo de referência	Rumax Ciclo de competição
Domínio III 992	1030 Vs. 992 -6	81	85 <sup>AA</sup>
Domínio III 1024	992 + 1030 Vs. 1024 -26	100	126 <sup>AA</sup>
Domínio I/II 1261	992 + 1030 + 1024 Vs. 1261 -13	157	177 <sup>AA</sup>
Domínio I 1347	992 + 1030 + 1024 -5	75	79 <sup>AA</sup>
Desconhecido Domínio 1361	992+1030+1024 Vs. 1361 -11	162	181 <sup>AA</sup>

FIG. 11A

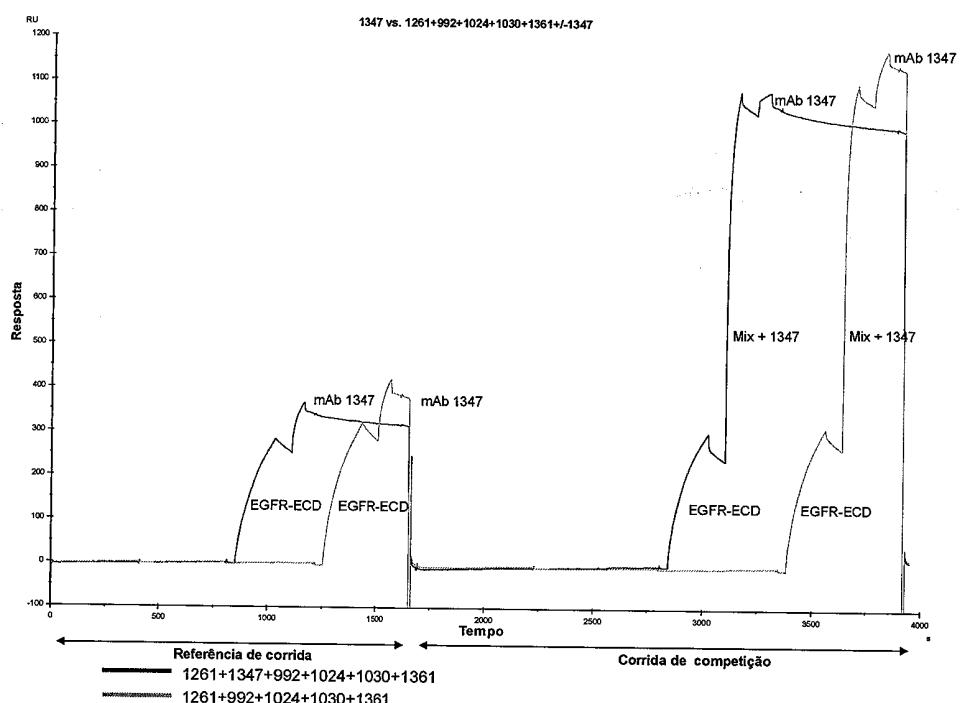
Amostra de mAb	Mistura de Anticorpo (N=6) 1261+1347+992+1024+1030+1361			Mistura de Anticorpo (N=6-1) Amostra de mAb sem teste		
	Amostra de Inibição mAb	Rumax Ciclo de Referência	Rumax Ciclo de Competição	Rumax Amostra de Inibição mAb	Rumax Ciclo de Referência	Rumax Ciclo de Competição
Domínio I/II 1261	1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1261 -95	135	7	1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1261 -21	139	168 <sup>AA</sup>
Domínio I 1347	1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1347 -80	91	19	1261+992+1024+1030+1361 Vs. 1347 -15	107	92
Domínio III 992	1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 992 -116	85	-14*	1261+1347+1024+1030+1361 Vs. 992 -56	71	111 <sup>AA</sup>
Domínio III 1024	1261+1347+992+1024+1030+1361 -113	110	-14*	1261+1347+992+1030+1361 Vs. 1024 -25	122	152 <sup>AA</sup>
Domínio III 1030	1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1030 -87	87	12	1261+1347+992+1024+1361 Vs. 1030 -10	74	82 <sup>AA</sup>
Domínio Desconhecido 1361	1261+1347+992+1024+1030+1361 Vs. 1361 -102	178	-3*	1261+1347+992+1024+1030 Vs. 1361 -24	159	152

FIG. 11B

12/49



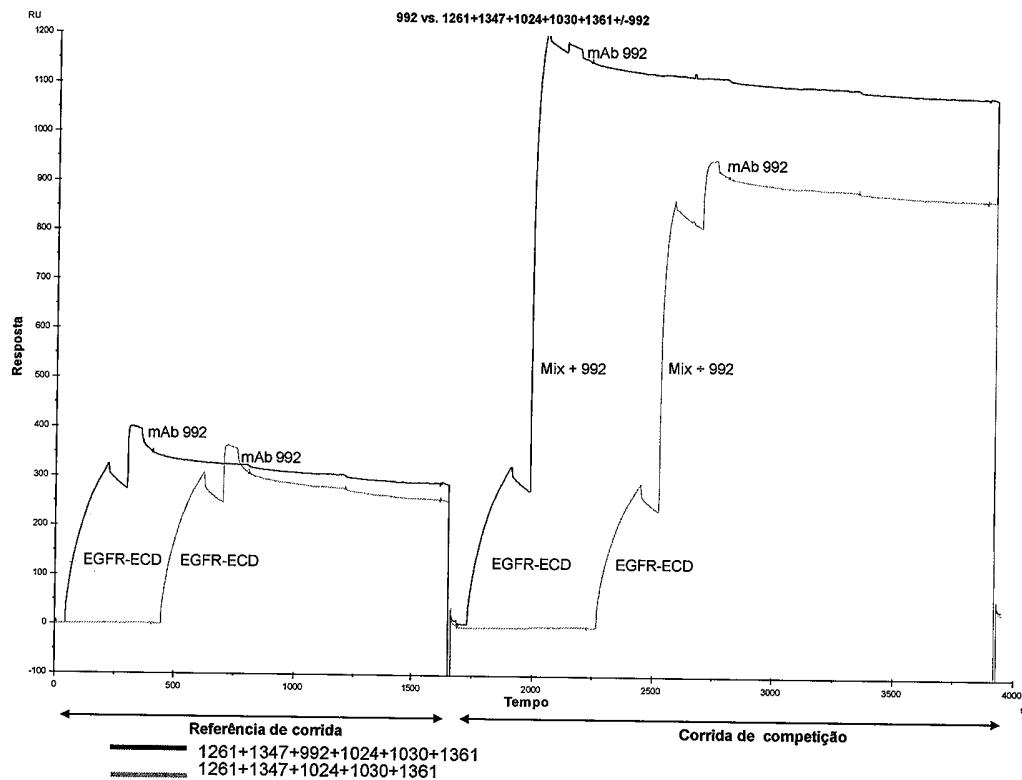
A) 1261 Vs. 1347+992+1024+1030+1361+/-1261



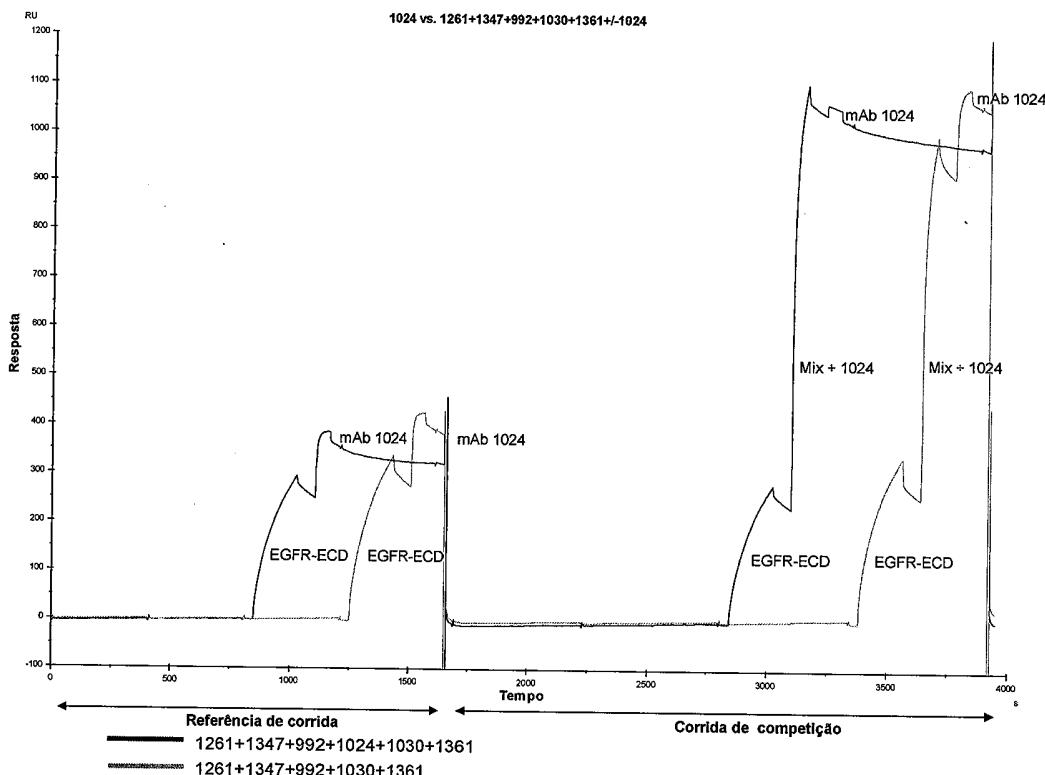
B) 1347 Vs. 1261+992+1024+1030+1361+/-1347

Fig. 11C

13/49



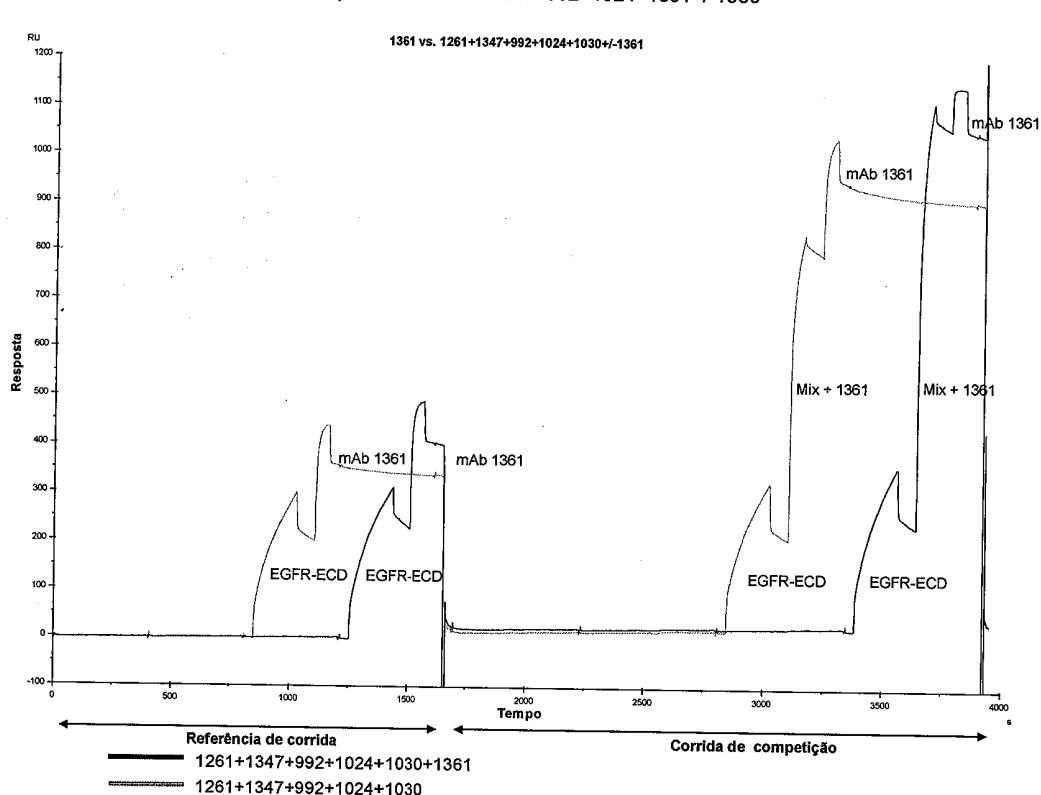
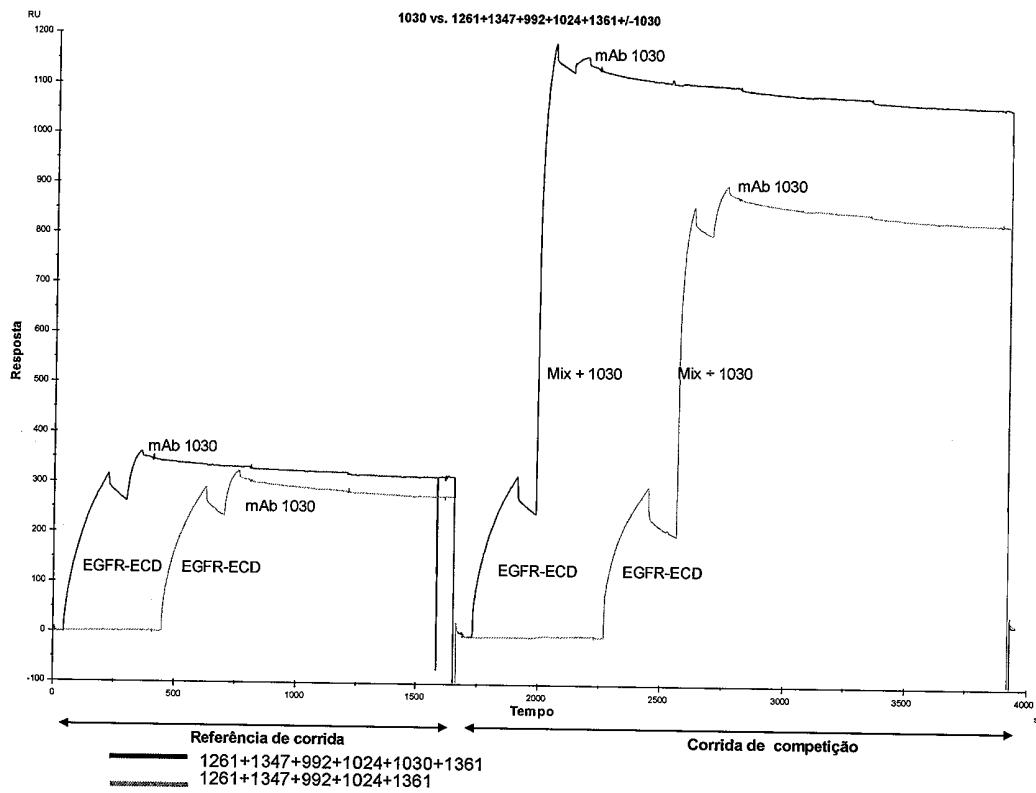
C) 992 Vs. 1261+1347+1024+1030+1361+/-992



D) 1024 Vs. 1261+1347+992+1030+1361+/-1024

Fig. 11C (Cont.)

14/49



F) 1361 Vs. 1261+1347+992+1024+1030+/-1361

Fig. 11C (cont.)

Domínio I	<b>1261+1347+992+1024+1030+1361</b> <b>Vs. 1284</b>		
	75	68	17
Domínio I/II	<b>1261+1347+992+1024+1030+1361</b> <b>Vs. 1257</b>		
	106	107	-7*
Desconhecido	<b>1261+1347+992+1024+1030+1361</b> <b>Vs. 1183</b>		
	112	56	-7*
Desconhecido	<b>1261+1347+992+1024+1030+1361</b> <b>Vs. 1255</b>		
	107	79	-5*

FIG. 11D

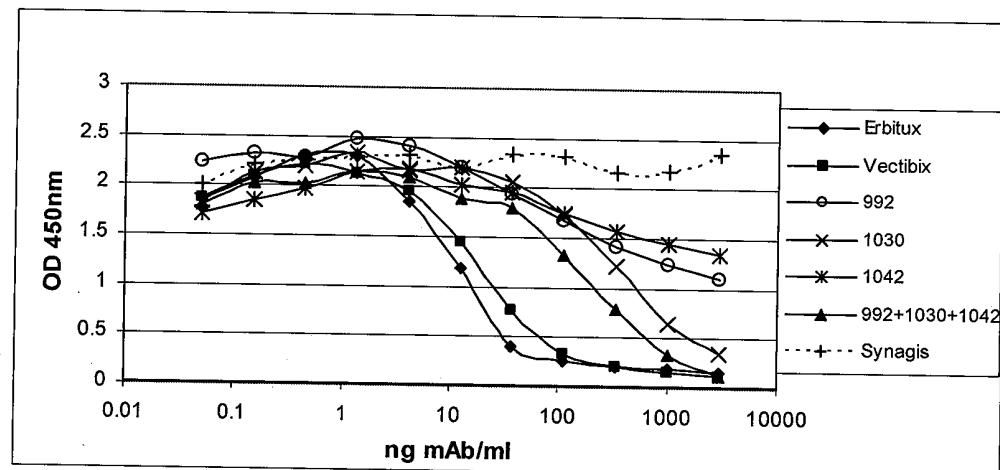


FIG. 12 A

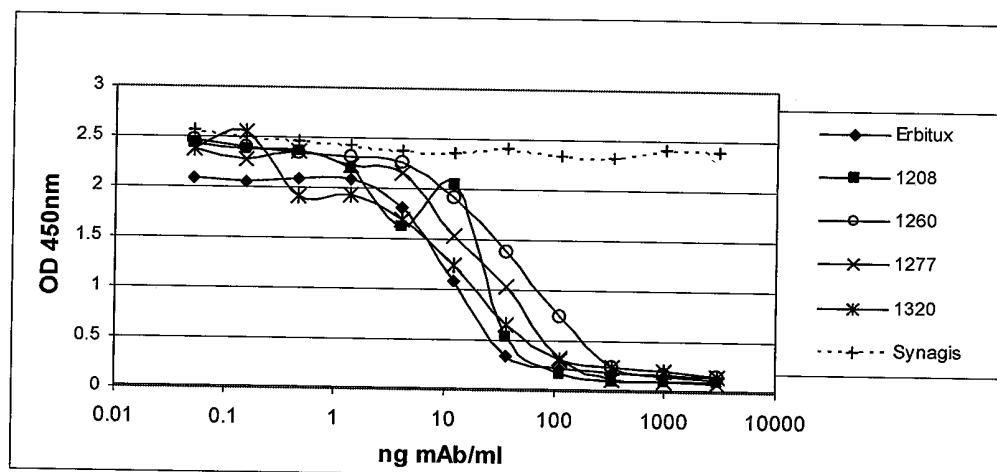


FIG. 12B

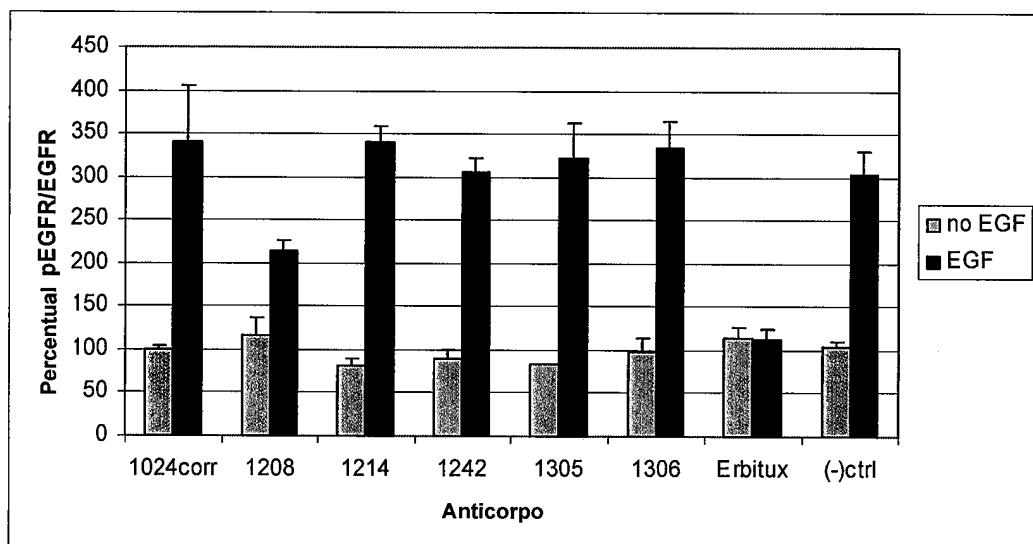


FIG. 13A

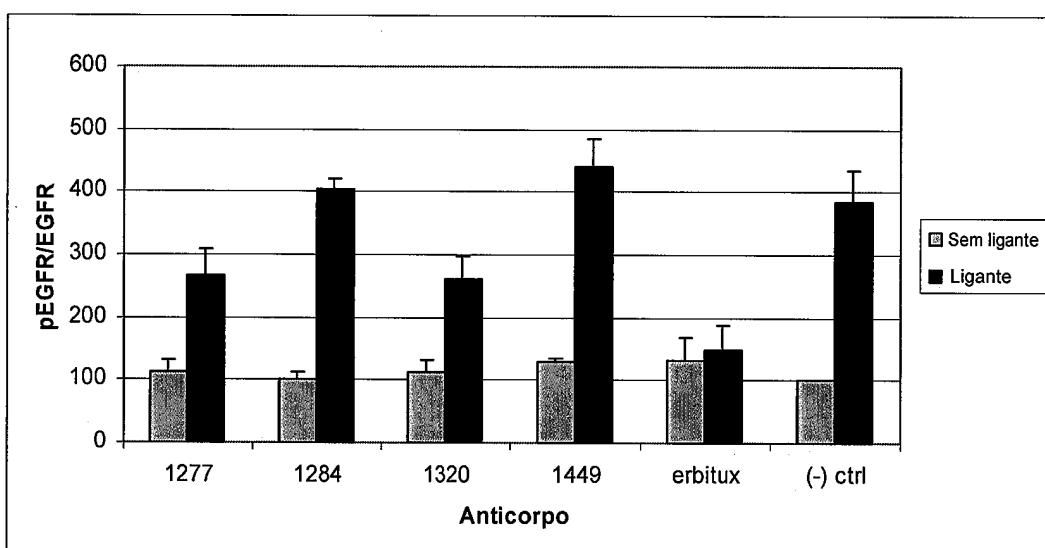


FIG. 13B

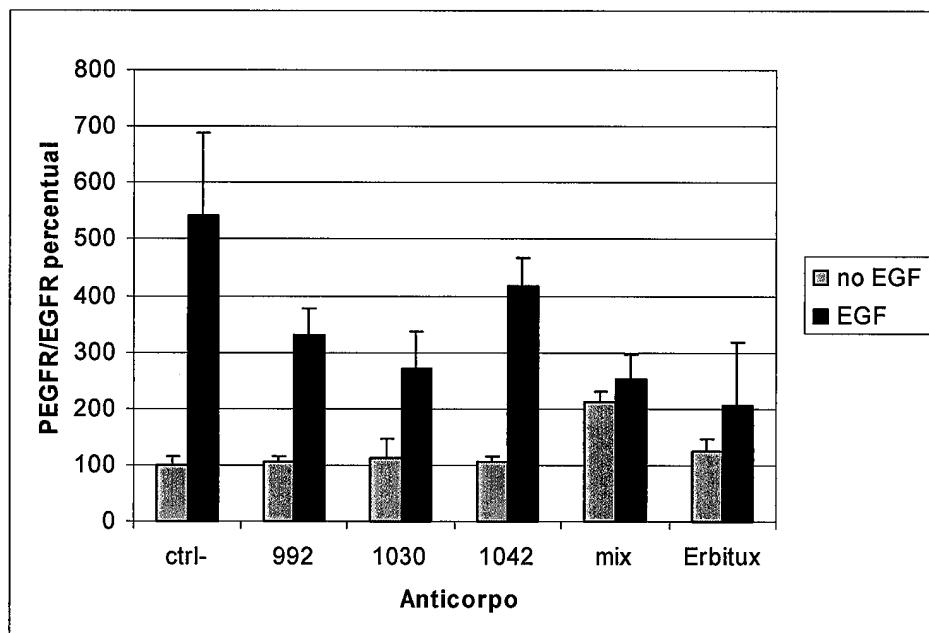


FIG. 14

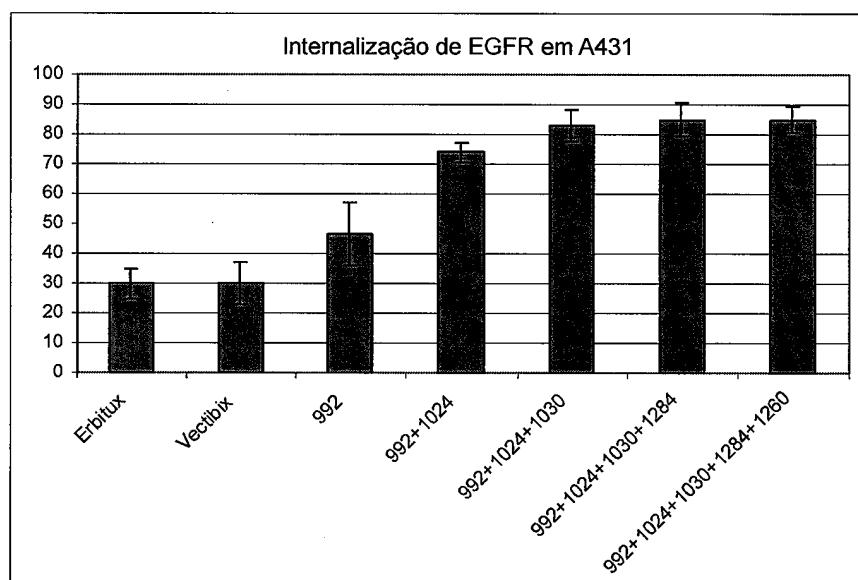


FIG. 15

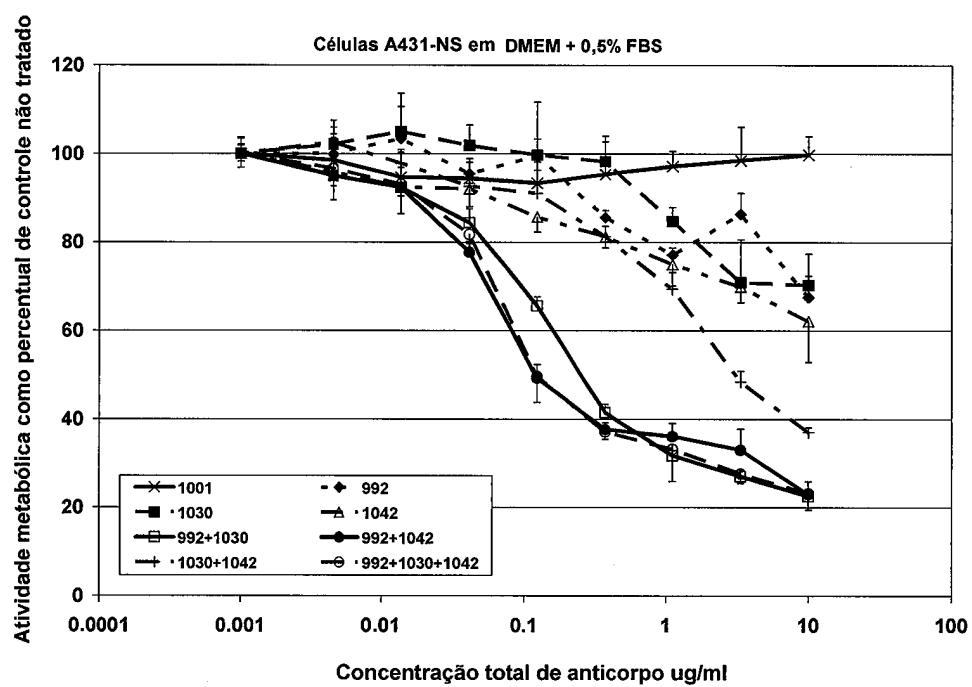


FIG. 16A

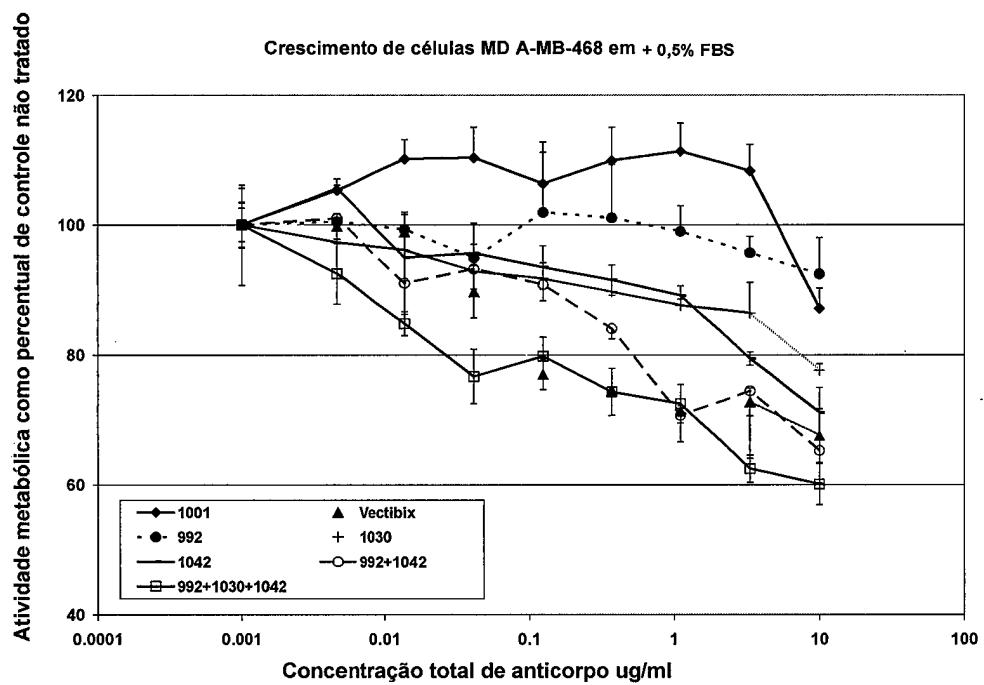


FIG. 16B

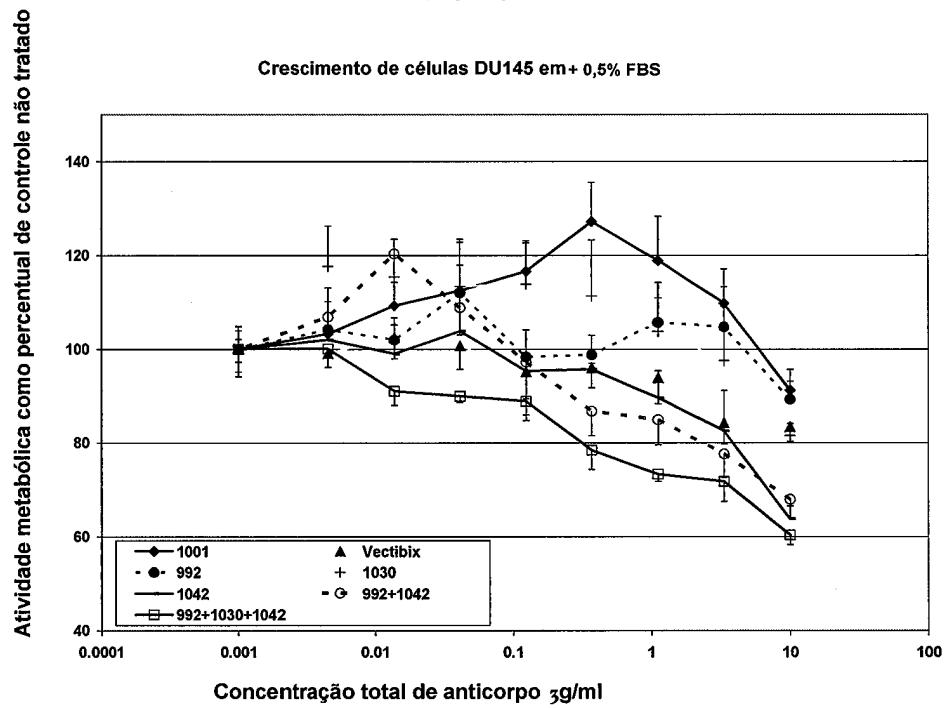


FIG. 16C

Efeito de 10  $\mu$ g/ml de anticorpo total sobre a atividade metabólica de células A431-NS na presença de concentrações variáveis de EGF

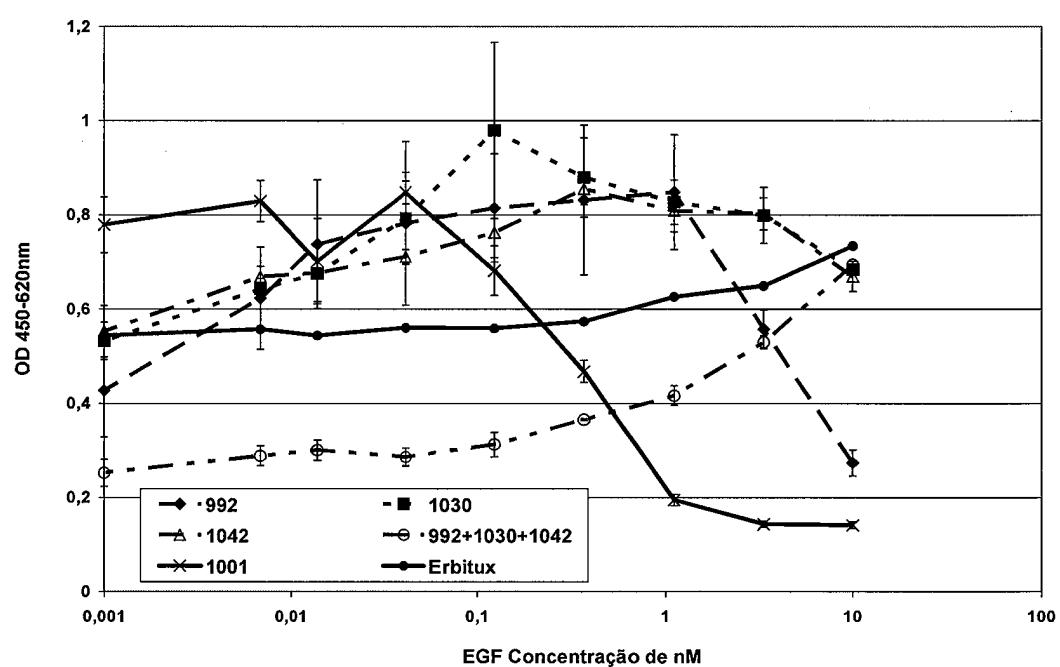


FIG. 17

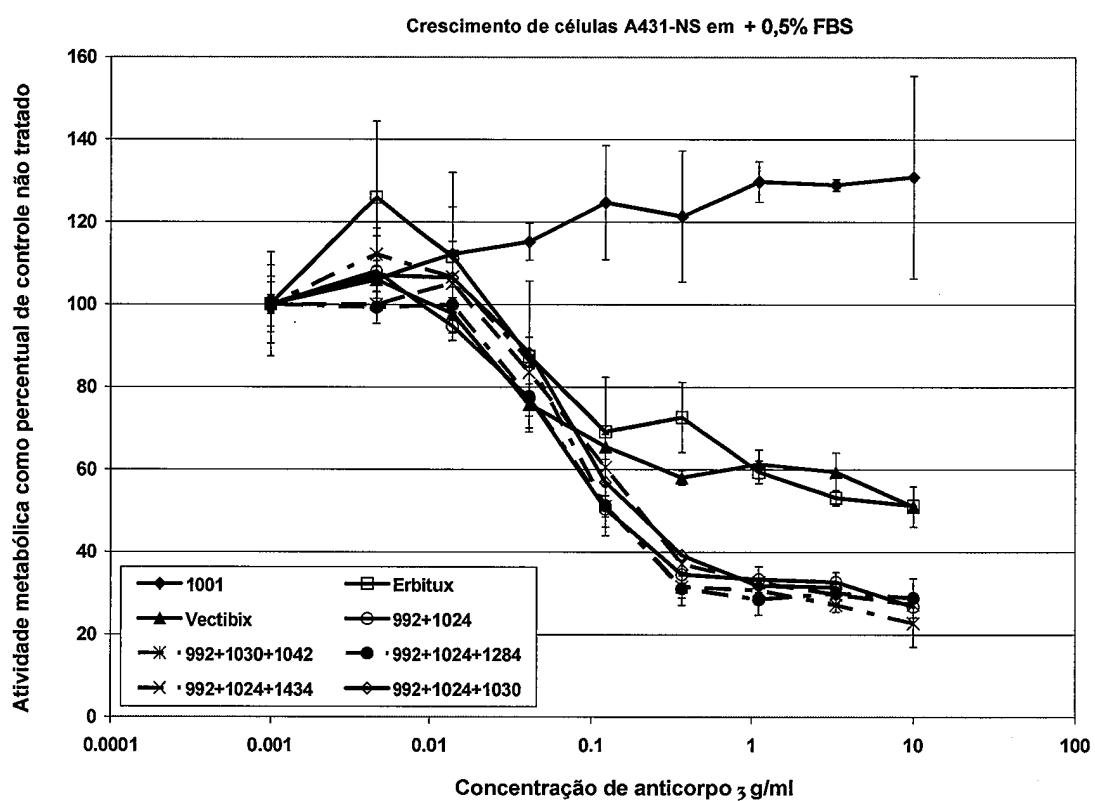


FIG. 18

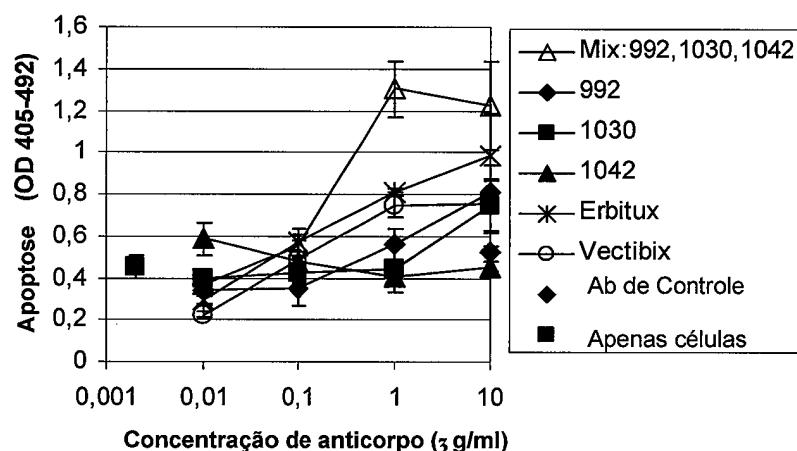


FIG. 19

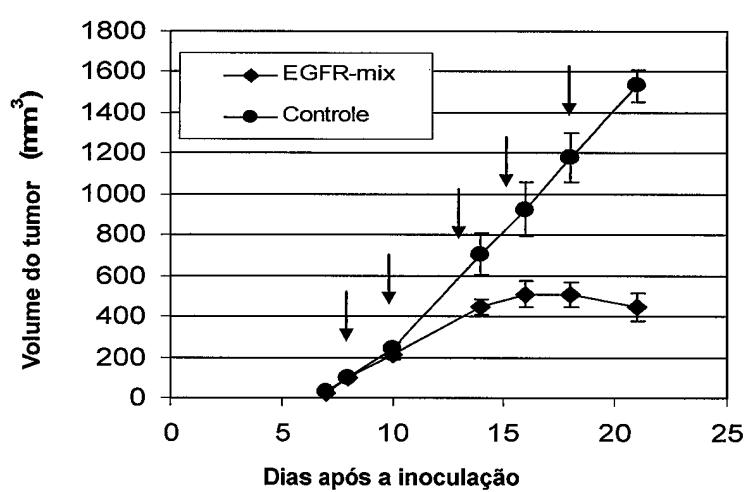


FIG. 20

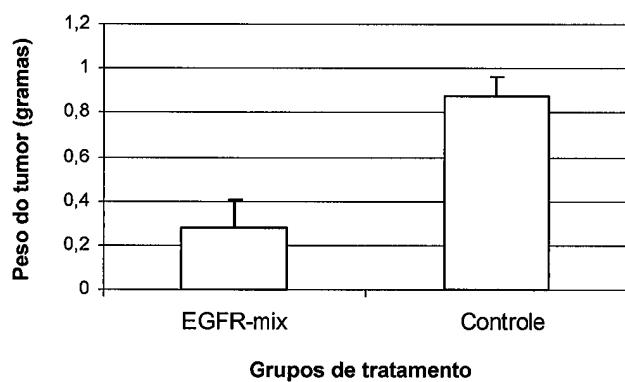


FIG. 21

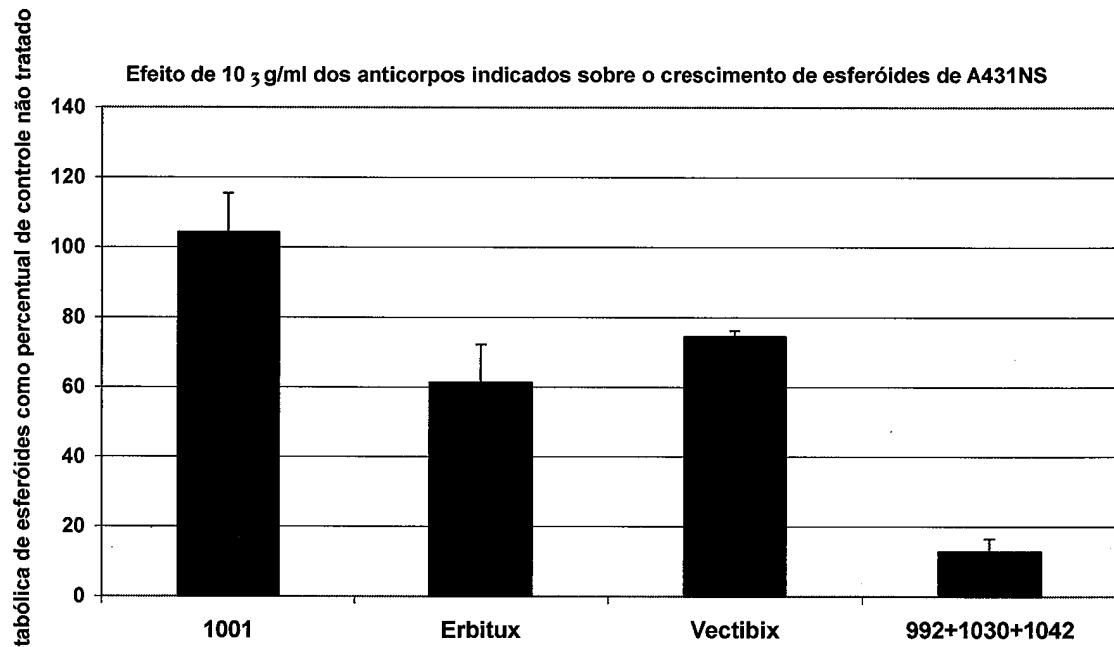


FIG. 22

ctggaggaaaagaaagtgtccaaggcacgagtaacaaactcacgcagttggcactttgaagatcatt  
 ttctcagcccccagaggatgttcaataactgtgaggtggccttggaaatttggaaattacctacgtgca  
 gagaattatgtatcttccttcttaagaccatccaggagggtggctttatgtcctcatgccctcaac  
 acagtggaggcgattcccttggaaaacacctgcagatcatcagaggaacatgtactatgaaaattcctatg  
 ccttagcagtcttatctaactatgtgcaaaataaacccggactgaaggagctgccatgagaaacttaca  
 gaaatcctgcattggcgccgtgcggcattggcaacaaccctgcctgtgcacacgtggagagcatccagg  
 cgggacatagtcagcagcgagtttcagcaactgtcgatggacttcagaaccacctggcagctgg  
 aaaagtgtgatccaagctgtcccaatgggagctgtgggggtcgaggagaggagaactgccaactgac  
 caaatcatctgtgcccacgcgtgtccggcgccgtgcggcaactgcctgtgcgcacaatccgagacgaag  
 cagtgtgcccggcgtgcacgggccccccggagagcactgcctgtgcgcacaatccgagacgaag  
 ccacgtgcaaggacacccatgccttgcattttactcatgcctacaacccaccacatccgatgtgac  
 cgaggcaatacagcttggtgccacccgtgtaagaagatgtccccgtattatgtggtacagatcac  
 ggctcgctgtcccgagctgcggggcgcacagctatgagatggaggaagacggcgcccaactgt  
 agtgcgaaggggcttgcgcacgcgtgttaatggaataggatattggtaattaaagacacactctccat  
 aaatgtctacaaatattaaacacttcaaaaactgcacccatcactgcgtgcacccatctggcgt  
 gcatttagggtgactccttgcacacacactccgcctctggatccacaggactggatattctgaaaacc  
 taaaggaaatcacagggttttgcgtattcaggctggcctgaaaacaggacggactccatgccttga  
 gaacctagaaatcatacgctggcaggaccaagcaacacggcgtcgttgcgtgcgtcgcctgaaac  
 ataacatccttggattacgcctcaaggagataagcgtatggatgtgataattcaggaacaaaa  
 atttgtctatgcacaaatacaataaaactggaaaaactgtttggacccatgcgtcggatattctgaaaacc  
 aagcaacagaggtaaaacagctgcacaggccacggccaggctgcctgcctgtgcctccggagg  
 tgctggggccggagccaggactgcgtctccgcagaatgtcagccaggacggatgcgtggaca  
 atgcacacatcctggcggggcgcacaggcgttgcgtggatgtgatgcatacactgcac  
 atgcctgcccaggcatgcacacatcactgcacaggacggggaccacactgtatccagtgcc  
 tacattgacggcccccactgcgtcaagacactgcctgcaggactcatgggagaaaaca  
 acaccctggatgcacccatccaaactgcacccatgcactggatgcactgg  
 aggtcttgcaggctgtgcacaggaaacgggctaaatccatcc

FIG. 23A

LEEKKVCQGTSNKLQLGTLEDHFLSLQRMFNNEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVIALNT  
 TVERIPLNLOIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKEPLPMRNLQEILHGAVRFNSNNPALCNVESIQW  
 RDIVSSEFLSNMSDFQNHLGSCQKCDPSCPNCWGAGEENCQKLTKIIACAQQCSGRCRGKSPSDCCCHN  
 QCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDH  
 GSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKCEGPCRKVONGIGIGEFKDLSINATNIKFKNCTSISGDLHILPV  
 AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHQFSLAVVSLN  
 ITSLGLRSLKEISDGDIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEG  
 CWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCNILEGEPEFVENSECIOCHPECLPOVMNITCTGRGPDNCIQCAH  
 YIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCARNGPKIPS

FIG. 23B

Cynomolgus EGFR ECD	(1) 1	10	20	30	47
Human EGFR ECD	(1) LEEKKVCQGTSNKLQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQ				
Consensus	(1) LEEKKVCQGTSNKLQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQ				
Section 2					
Cynomolgus EGFR ECD	(48) 48	60	70	80	94
Human EGFR ECD	(48) RNYDLSFLKTIQEVAEVAGYVIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYA				
Consensus	(48) RNYDLSFLKTIQEVAEVAGYVIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYA				
Section 3					
Cynomolgus EGFR ECD	(95) 95	100	110	120	130
Human EGFR ECD	(95) LAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEI	LHGAVRFSNNP	ALCNVESIQWR		141
Consensus	(95) LAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEI	LHGAVRFSNNP	ALCNVESIQWR		
Section 4					
Cynomolgus EGFR ECD	(142) 142	150	160	170	188
Human EGFR ECD	(142) DIVSS <del>E</del> FLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTK				
Consensus	(142) DIVSS <del>E</del> FLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTK				
Section 5					
Cynomolgus EGFR ECD	(189) 189	200	210	220	235
Human EGFR ECD	(189) IICAAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT				
Consensus	(189) IICAAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT				
Section 6					
Cynomolgus EGFR ECD	(236) 236	250	260	270	282
Human EGFR ECD	(236) CKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGS				
Consensus	(236) CKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGS				
Section 7					
Cynomolgus EGFR ECD	(283) 283	290	300	310	329
Human EGFR ECD	(283) CVRACGADS <del>Y</del> MEEDGVRKCKCEGPCRVCNGIGIGEFKD <del>S</del> LSINA				
Consensus	(283) CVRACGADS <del>Y</del> MEEDGVRKCKCEGPCRVCNGIGIGEFKD <del>S</del> LSINA				
Section 8					
Cynomolgus EGFR ECD	(330) 330	340	350	360	376
Human EGFR ECD	(330) TNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPLDPQELDILKTVKE				
Consensus	(330) TNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPLDPQELDILKTVKE				
Section 9					
Cynomolgus EGFR ECD	(377) 377	390	400	410	423
Human EGFR ECD	(377) ITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHQFSLAVVSLNITS				
Consensus	(377) ITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHQFSLAVVSLNITS				

FIG. 24

(424) 424	430	440	450	460	470
Cynomolgus EGFR ECD	424	LGLRS <del>L</del> KEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQTKIISNR			
Human EGFR ECD	(424)	LGLRS <del>L</del> KEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNR			
Consensus	(424)	LGLRS <del>L</del> KEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTS	QTKIISNR		
<u>Section 11</u>					
(471) 471	480	490	500		517
Cynomolgus EGFR ECD	(471)	GENSKATGQVCHALCSPEGCWGP <del>E</del> P <del>R</del> DCVSCQNVSRGRECVDKCNT			
Human EGFR ECD	(471)	GENSKATGQVCHALCSPEGCWGP <del>E</del> P <del>K</del> DCVSCRNVSRGRECVDKCNT			
Consensus	(471)	GENSKATGQVCHALCSPEGCWGP <del>E</del> EPKDCVSC	NVSRGRECVDKCNT		
<u>Section 12</u>					
(518) 518	530	540	550		564
Cynomolgus EGFR ECD	(518)	LEGE <del>P</del> RFVENSECIQCHPECLPQVMNI <del>T</del> CTGRGP <del>D</del> NCIQC <del>A</del> H <del>Y</del> IDG			
Human EGFR ECD	(518)	LEGE <del>P</del> RFVENSECIQCHPECLPQAMNI <del>T</del> CTGRGP <del>D</del> NCIQC <del>A</del> H <del>Y</del> IDG			
Consensus	(518)	LEGE <del>P</del> RFVENSECIQCHPECLPQ	MNI <del>T</del> CTGRGP <del>D</del> NCIQC <del>A</del> H <del>Y</del> IDG		
<u>Section 13</u>					
(565) 565	570	580	590	600	611
Cynomolgus EGFR ECD	(565)	PHCVKTC <del>P</del> AGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG			
Human EGFR ECD	(565)	PHCVKTC <del>P</del> AGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG			
Consensus	(565)	PHCVKTC <del>P</del> AGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG			
<u>Section 14</u>					
(612) 612	622				
Cynomolgus EGFR ECD	(612)	CARNGPKIPS-			
Human EGFR ECD	(612)	CPTNGPKIPS-			
Consensus	(612)	C NGPKIPS			

FIG. 24 cont.

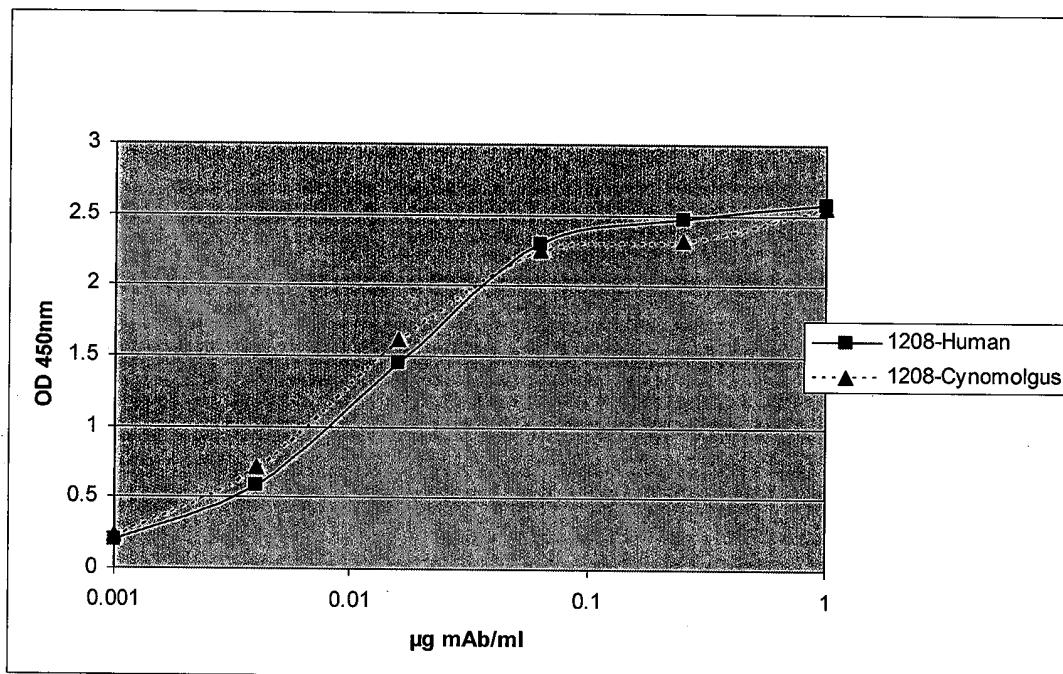


FIG. 25A

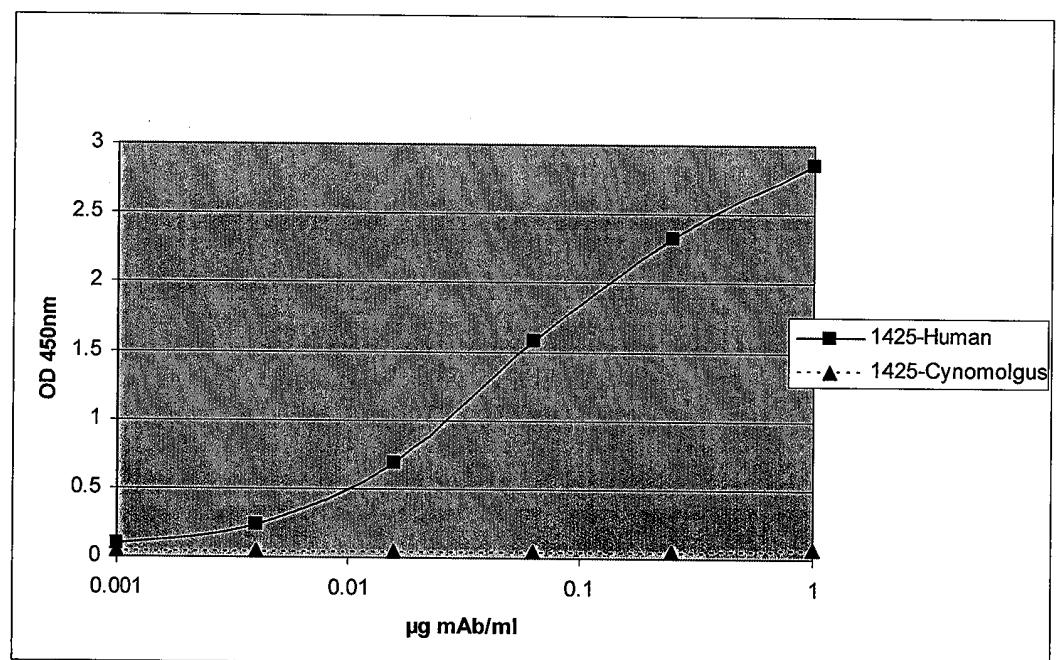


FIG. 25B

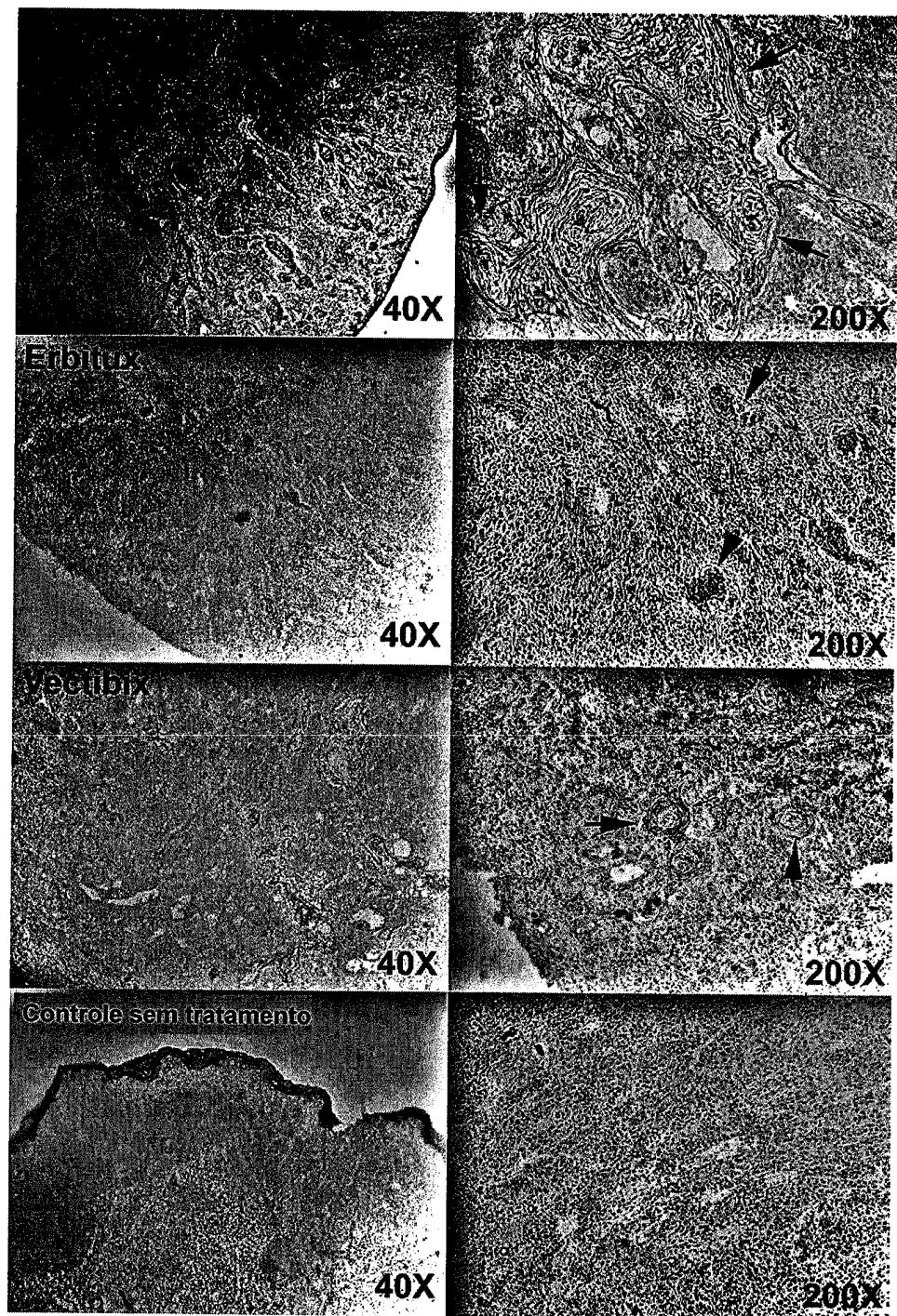


FIG. 26

30/49

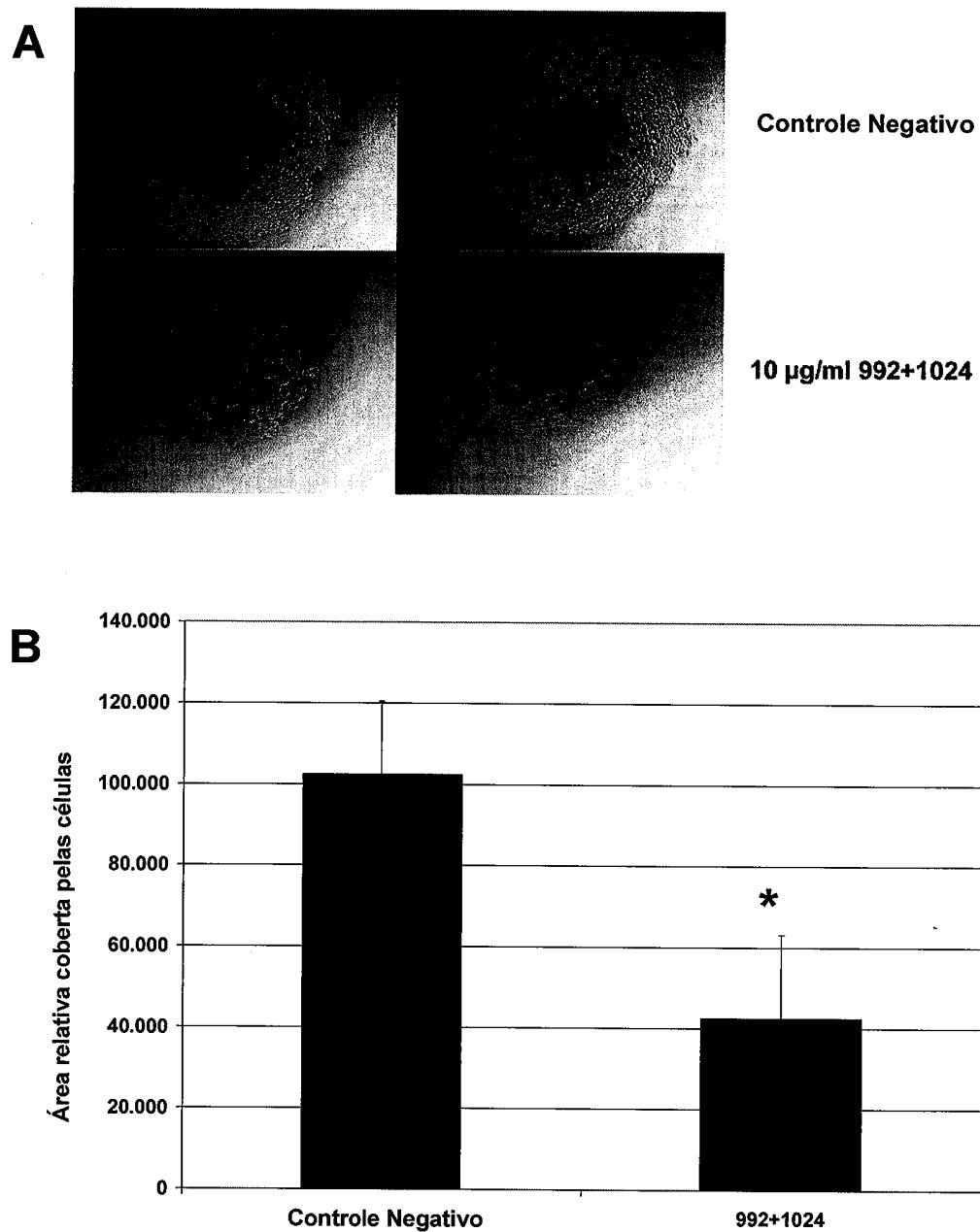


FIG. 27

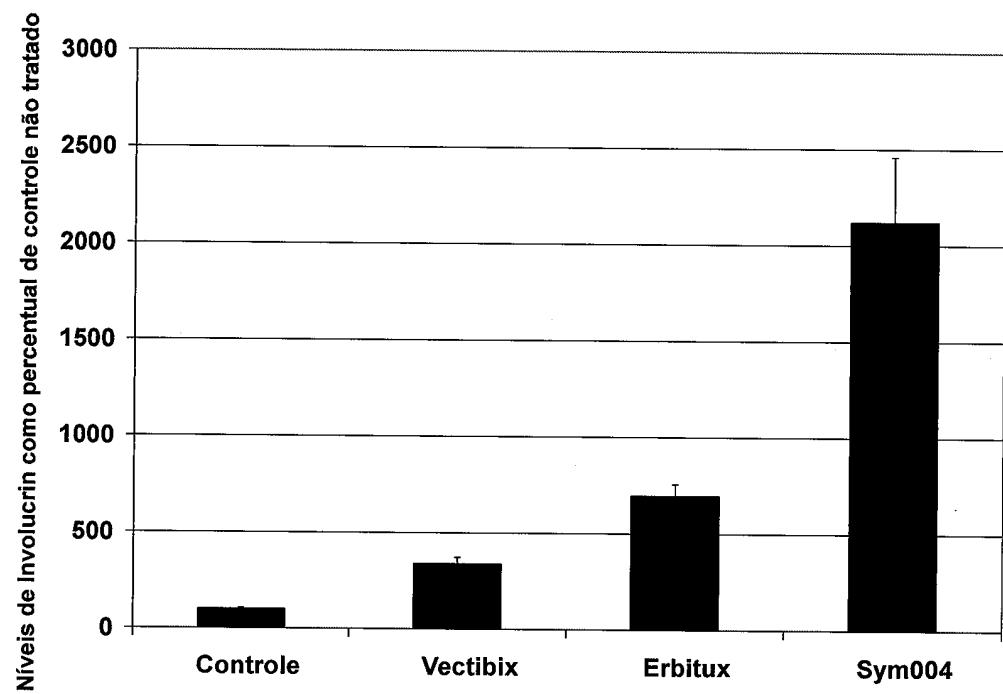
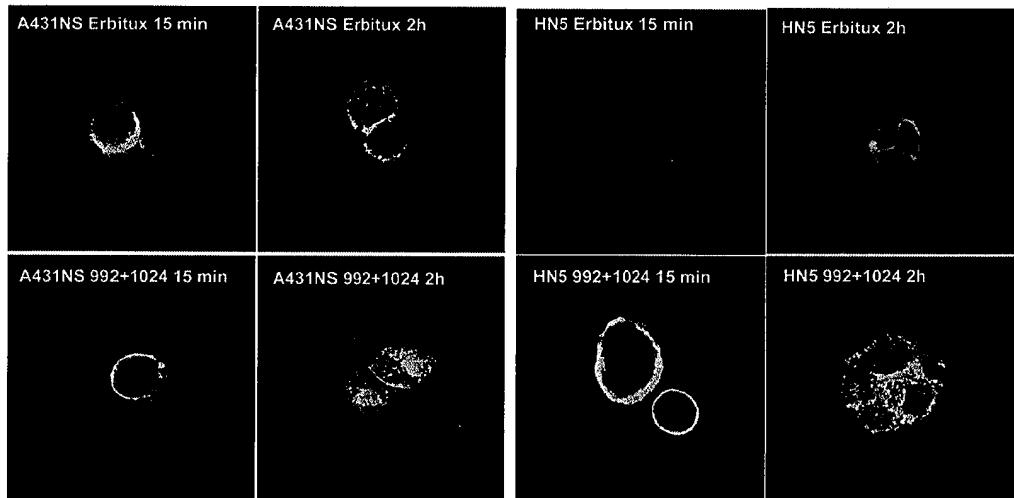


FIG. 28

32/49

A)



B)

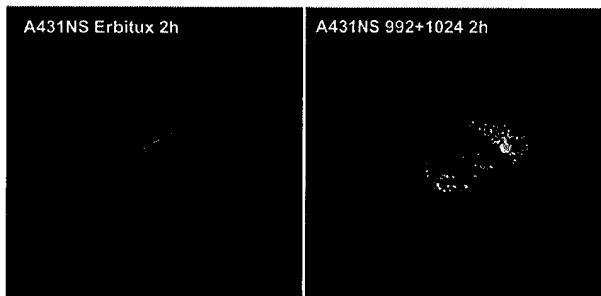


FIG. 29

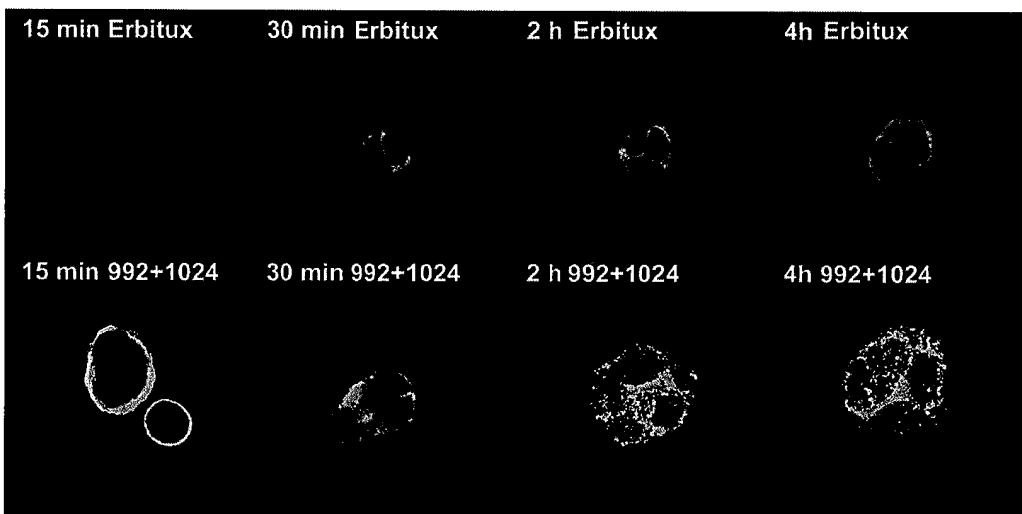


FIG. 30

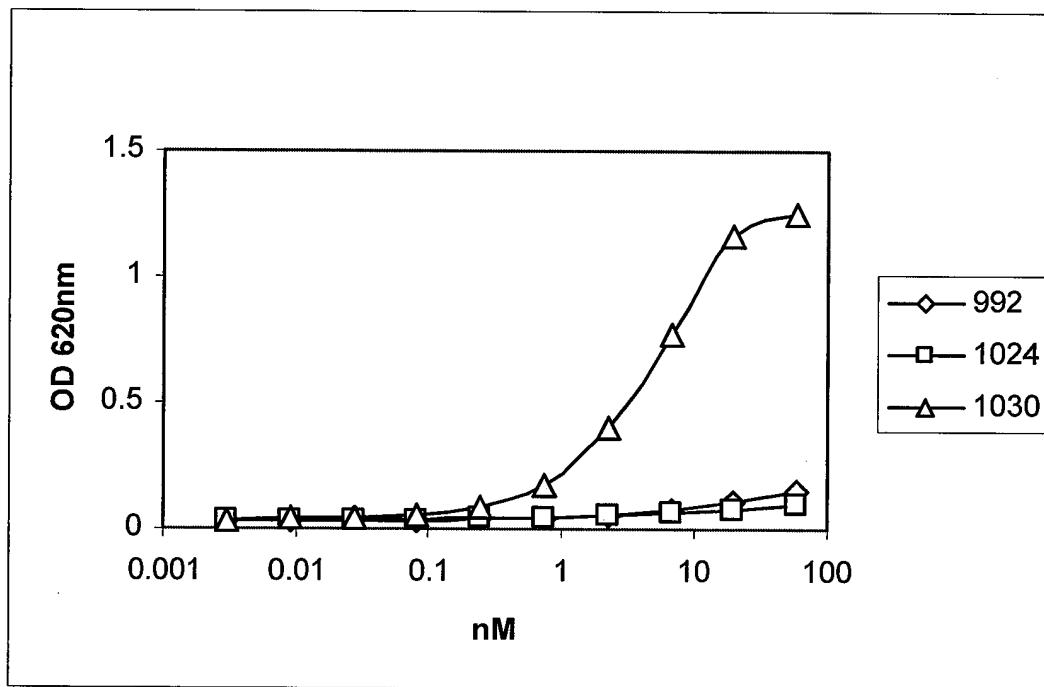


FIG. 31A

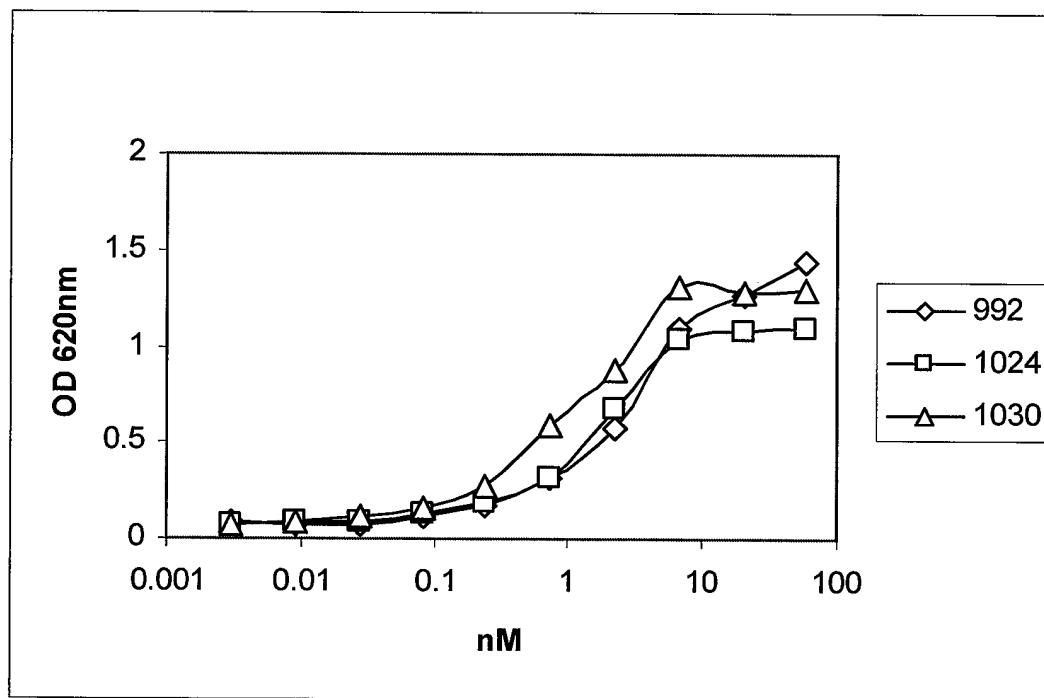


FIG. 31B

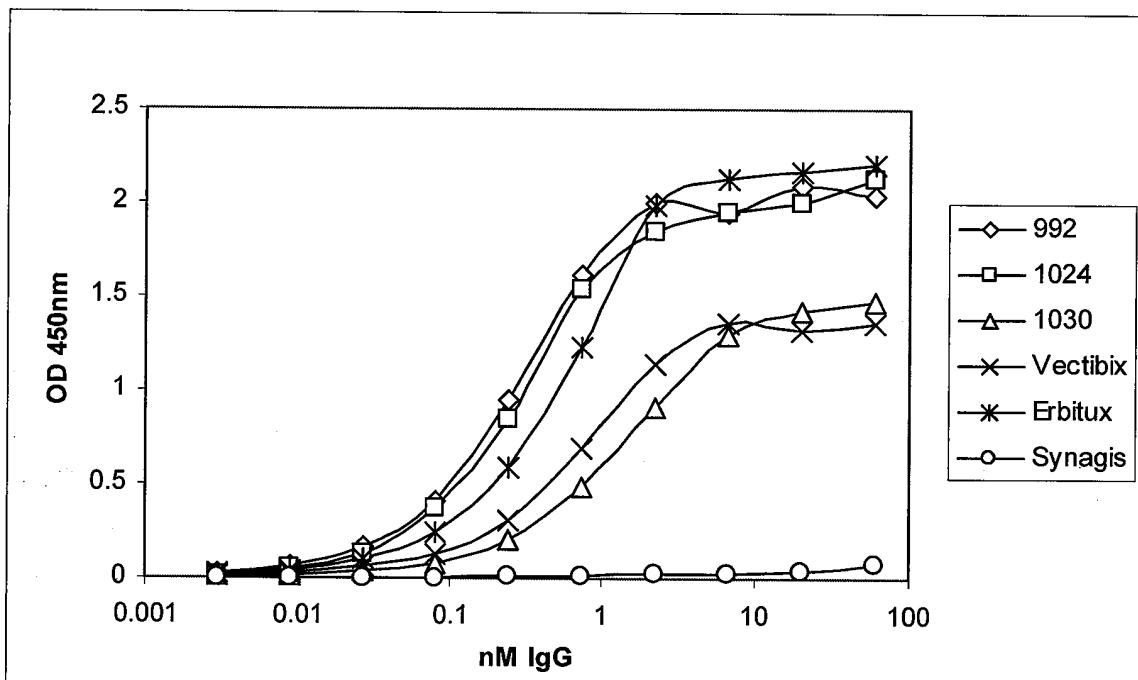


FIG. 32A

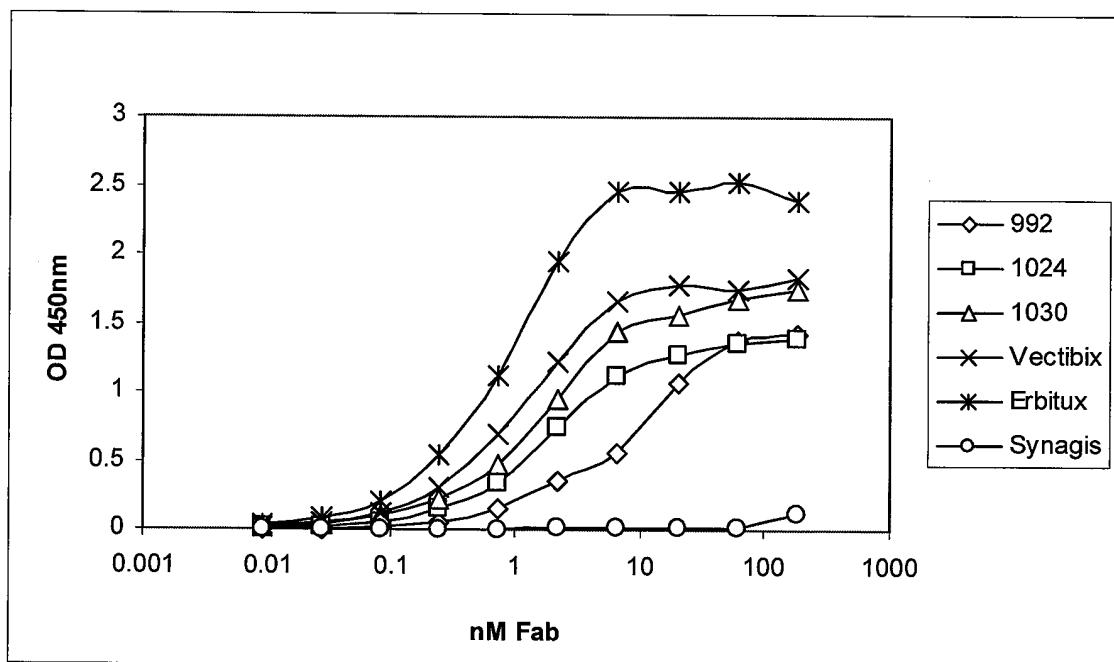


FIG. 32B

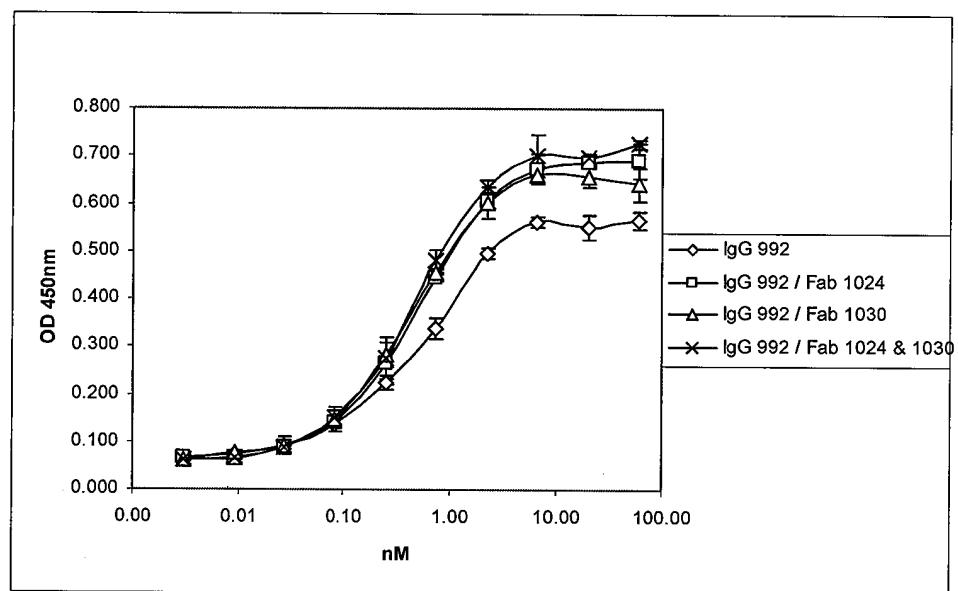


FIG. 33A

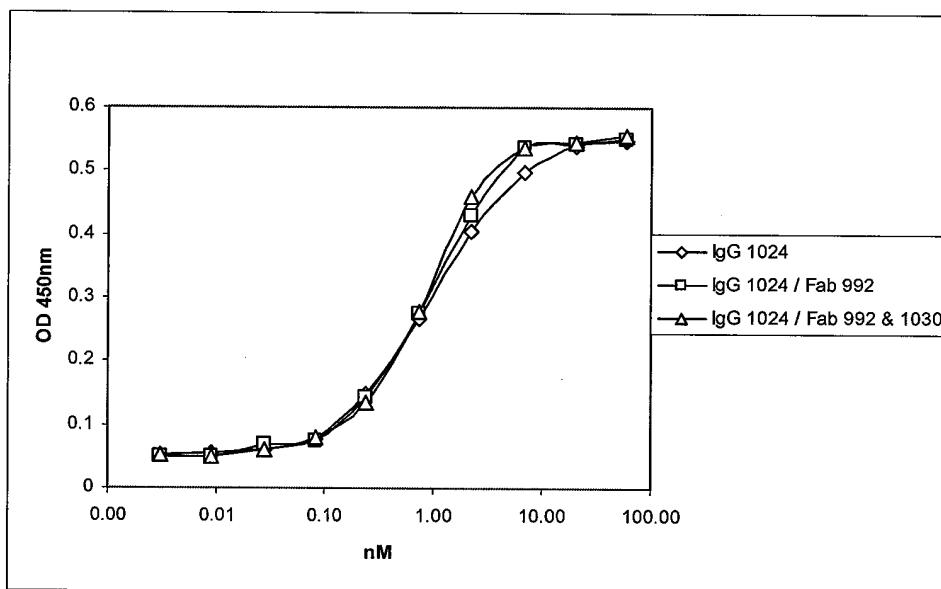


FIG. 33B

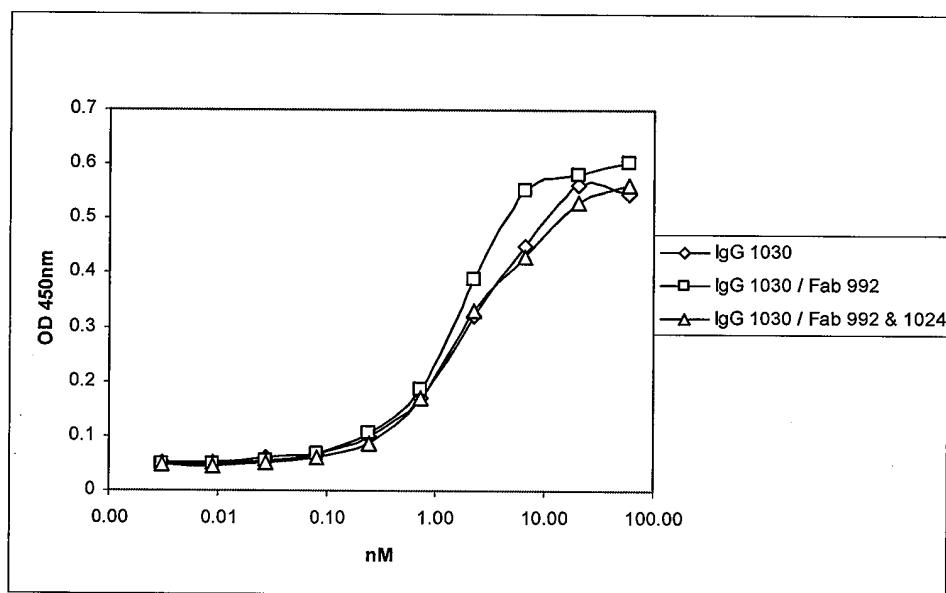


FIG. 33C

Fig. 34A

gaaatggctgcaaagctgttccatcaaggaagacagacttcttacagcgatacagctcagacccacaggcgccctt  
gactgaggacagcatagacgacaccccttcctccactgcctgaatacataaaaccagtctgttccaaaaggcccgc  
ggctctgtgcagaatcctgtctatcacaatcagcctctgaaccctgcgcccagcagagacccacactaccaggacc  
ccccacagcaccgcagtggcaaccccgagtatctcaacactgtccagcccacctgtcaacagcacattcgacag  
ccctgctcattggcccaagaaaggcagccaccaaattagcctggacaaccctgactaccagcaggactttccc  
aaggaagccaagccaaatggcatcttaaggctccacagctgaaaatgcagaataacctaagggtcgaccacaaa  
gcagtgaatttattggagcatga

Fig. 34A (Cont.)

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVQCQTSNKLQLGTFEDHFLSLQRMFNNEV  
VLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEAVGYLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALA  
VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSEFLSNMSMDF  
QNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAAQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGC  
TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYY  
VTDHGSCVRACGADSYEEMEDGVRKCKCEGPCRKVNGIGIGIGEFKDTLSINATNIKHFK  
NCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAF  
ENLEIIIRGRTKQHGQFSLAVSLNITSLGLRSLKEISDGDIISGNKNLCYANTINWKKL  
FGTSSQTKIISNRGENSKATGQVCHALCPEGCWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCN  
ILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVM  
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCCTGPGLEGCARNGPKIPSIAATGMVGALLLLVV  
ALGIIGLFMRRRHIVRKRTLRLQQERELEVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGS  
GAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGI  
CLTSTVQLITQLMPPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMYLEDRLVHRDLAA  
RNVLVKTPOQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPKWMALESILHRIYTHQSDVWSY  
GVTWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPK  
FRELIIIFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPSTSNNSTVACIDRNGLQSCSIKEDSFLQRYSSDPTGALTED  
SIDDTCFLPVPEYINQSVPKRAGSVQNPNQPLNPAPS RDPHYQDPHSTAVGNPEYLN  
TVQPTCVNSTFDSPAHLAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRV  
APQSSEFIGA

Fig. 34B

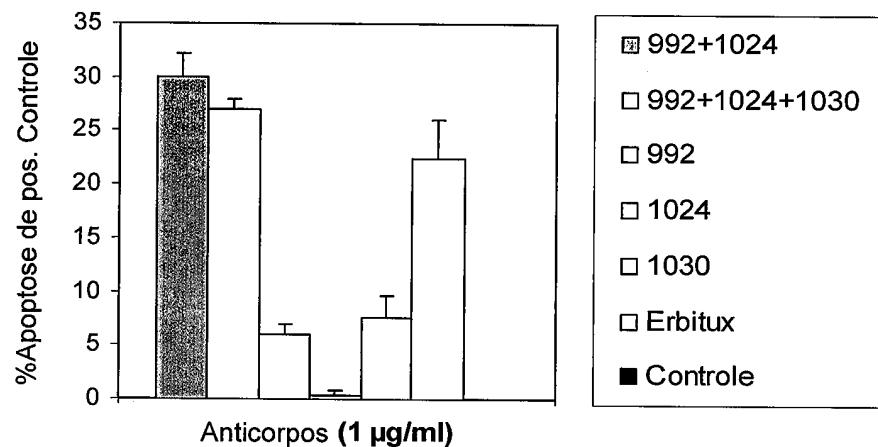


FIG. 35

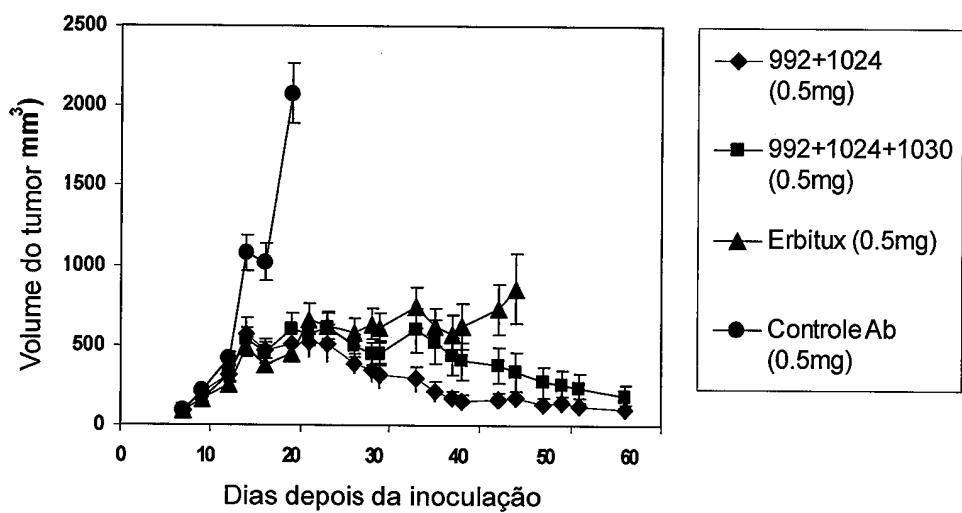


FIG. 36

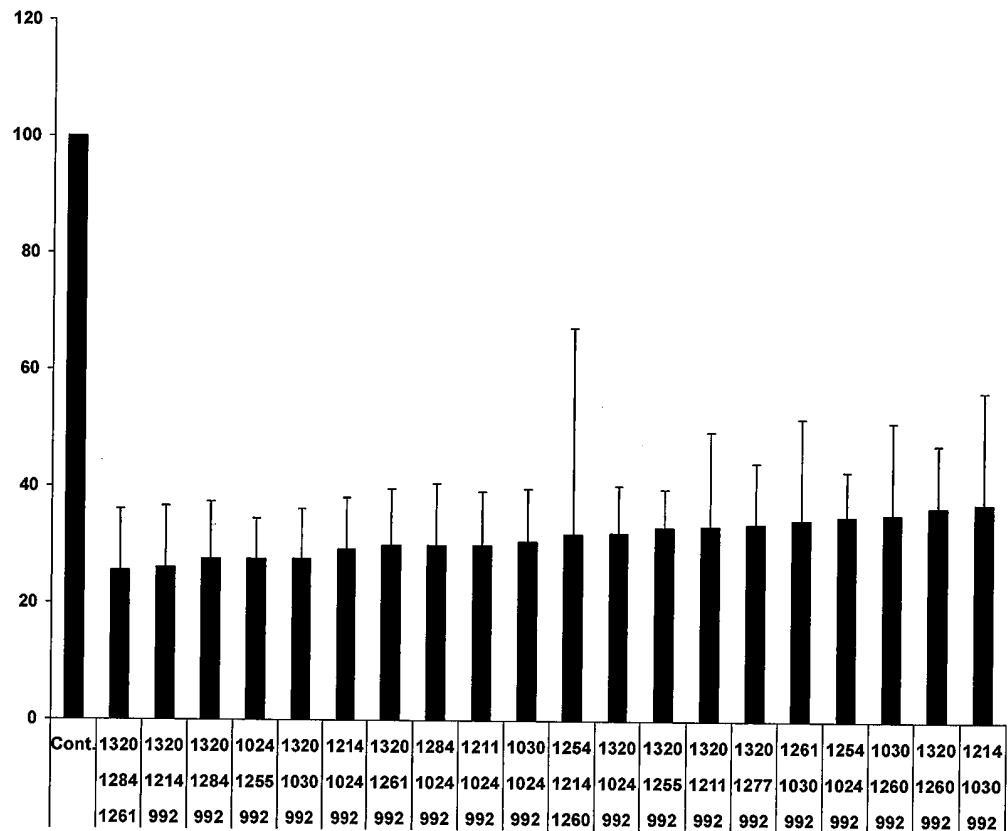


FIG. 37

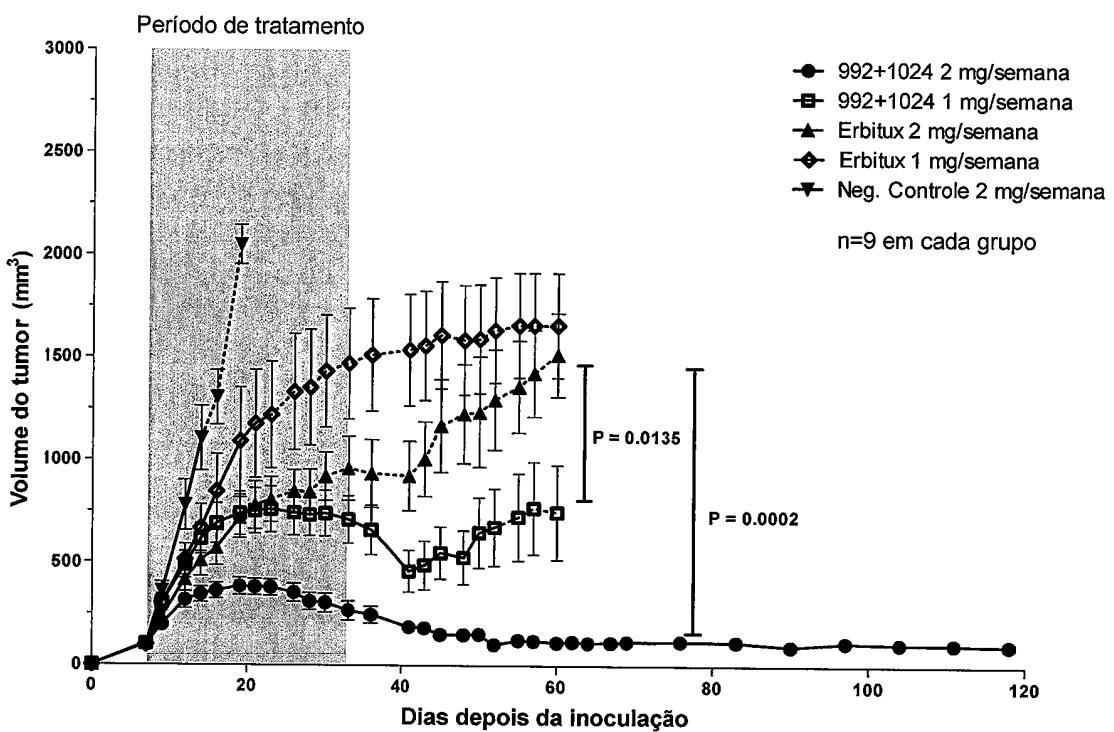


FIG. 38

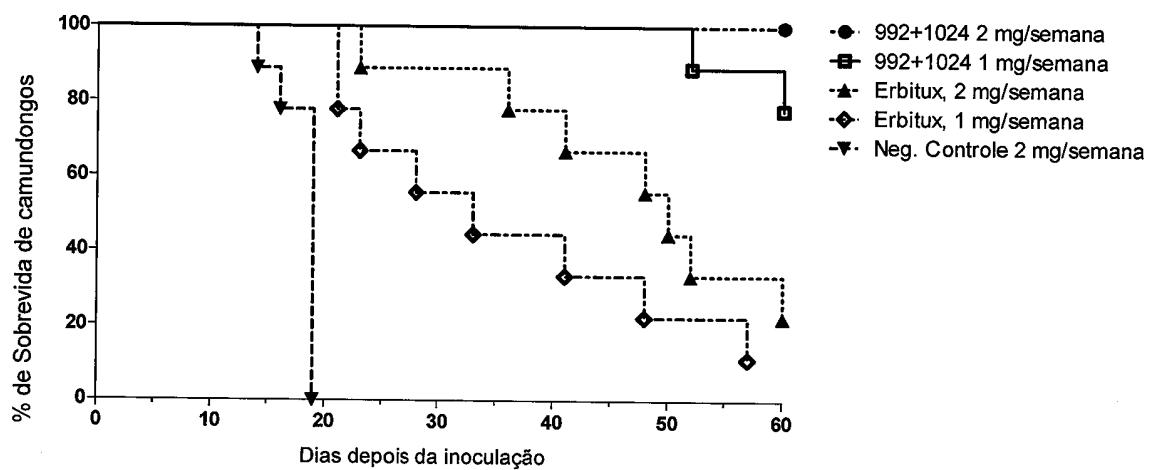


FIG. 39

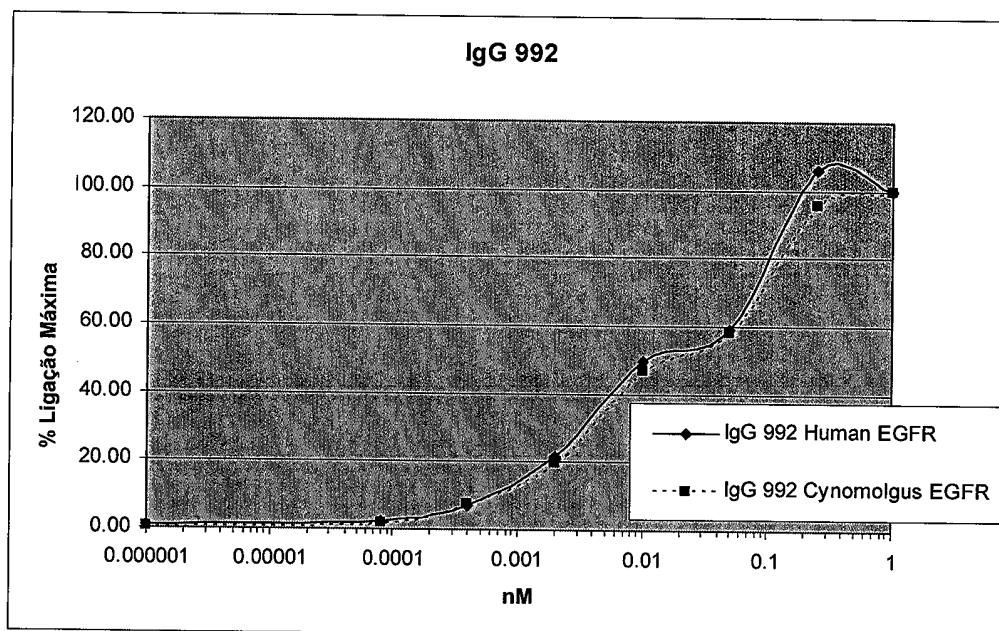


FIG. 40A

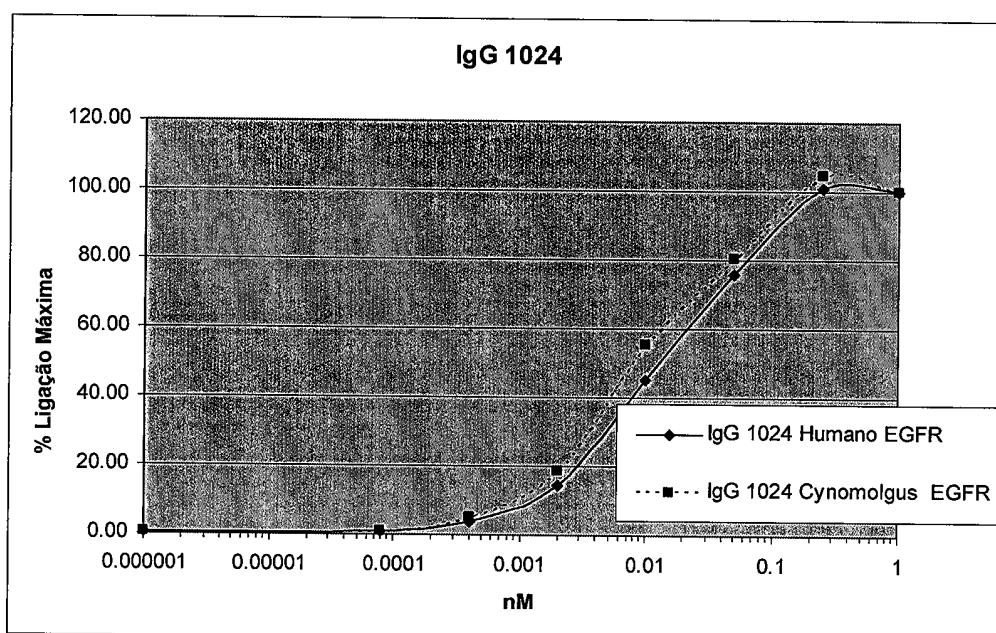


FIG. 40B

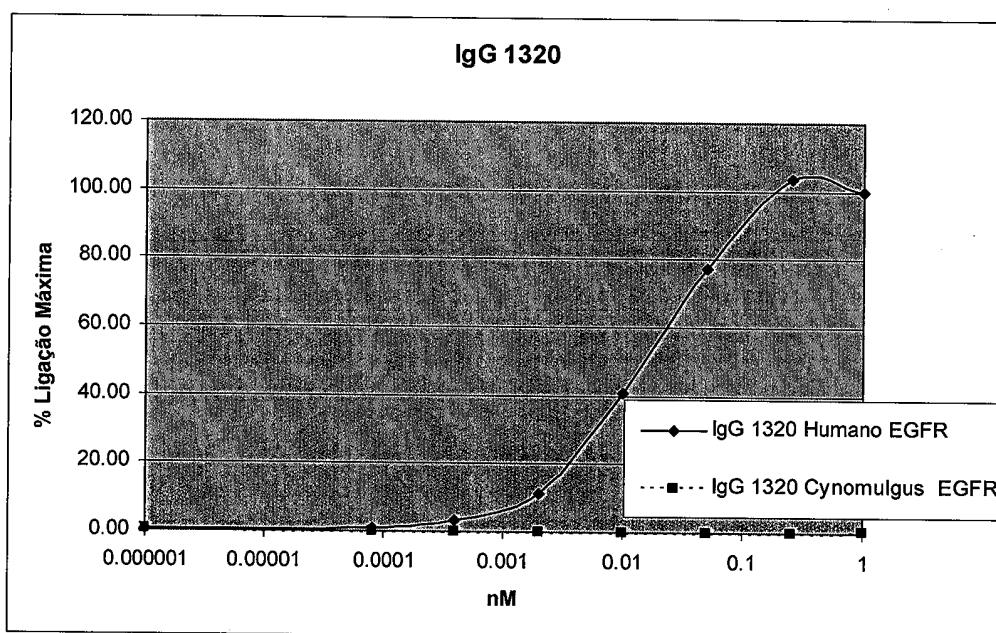


FIG. 40C

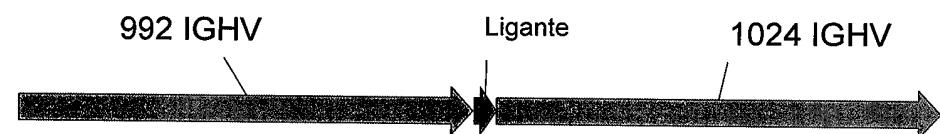
hu992VH chi992VH	QVQLVQSGA-EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYW---MHWVRQAPGQGLEWMGIYPPGS 60 EVQLQQPGS-ELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYW---MHWVKQRPGQGLEWIGNIYPPGS 60 ***** *.*: *: :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
hu992VH chi992VH	RST--SYAQKFQ-GRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDY 117 RST--NYDEKFK-SKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYYVSSGDAMDY 117 *** .* :**: .:.*: *:***:***:***:***:*****:*****:*****:*****
hu992VH chi992VH	WGQGTILTVS 127 WGQGTSVTVS 127 ***** *****
hu992VL chi992VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNY-----LAWYQQKPGKVPKLLIYYTS-- 60 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNY-----LNWYQQKPDGTVKLLIYYTS-- 60 ** ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Hu992VL chi992VL	-----TLQSGVP-SRFSGSG-SGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHYNT---VPPTFGGGTKV 124 -----RLHSGVP-SRFSGSG-SGTDFTSLTINNVEQEDVATYFCQHYNT---VPPTFGGGTKL 124 _____*:***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
hu992VL chi992VL	EIK 127 EIK 127 ***

FIG. 41B

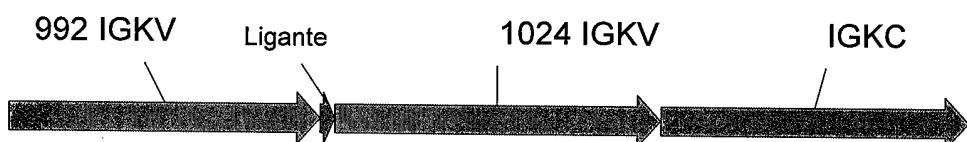
hu1024VH chi1024VH	QVQLVQSGA-EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHW---MHWVRQAPGQGLEWMGINPSS 60 QVQLQQPGA-ELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHW---MHWVKQRPGQGLEWIGEINPSS 60 ***** *.*: *: .:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
hu1024VH chi1024VH	GRN--NYAQKFQ-GRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARYGYDE-AMDYWGQG 121 GRN--NYNEKFK-SKATLTVDKSSSTAYMQFSLLTSEDSAVYYCVRYGYDE-AMDYWGQG 121 *** ** :**: .:.*: *.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
hu1024VH chi1024VH	TSVTVS 127 TLVTVS 127 * *****
chi1024VL hu1024VL	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITY-LYWYLQKPGQSPQLLIYQMS-- 65 DIVMTQSPSLPVTPEGPASISCRSSKSLLHSNGITY-LDWYLQKPGQSPQLLIYQMS-- 65 *****:.* *** * .*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
chi1024VL hu1024VL	-----NLASGVP-DRFSSSG--SGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLE---LPYTFGGTKL 124 -----NRASGVP-DRFSGSG--SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLE---LPYTFGGTKV 124 _____*:***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
chi1024VL hu1024VL	EIK 127 EIK 127 ***

FIG. 41B

44/49

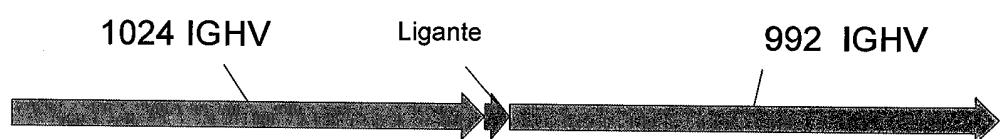


992L1024 IGHV

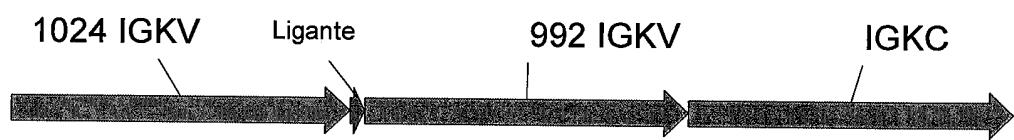


992L1024 IGKV

FIG. 42A



1024L992 IGHV



1024L992 IGKV

FIG. 42B

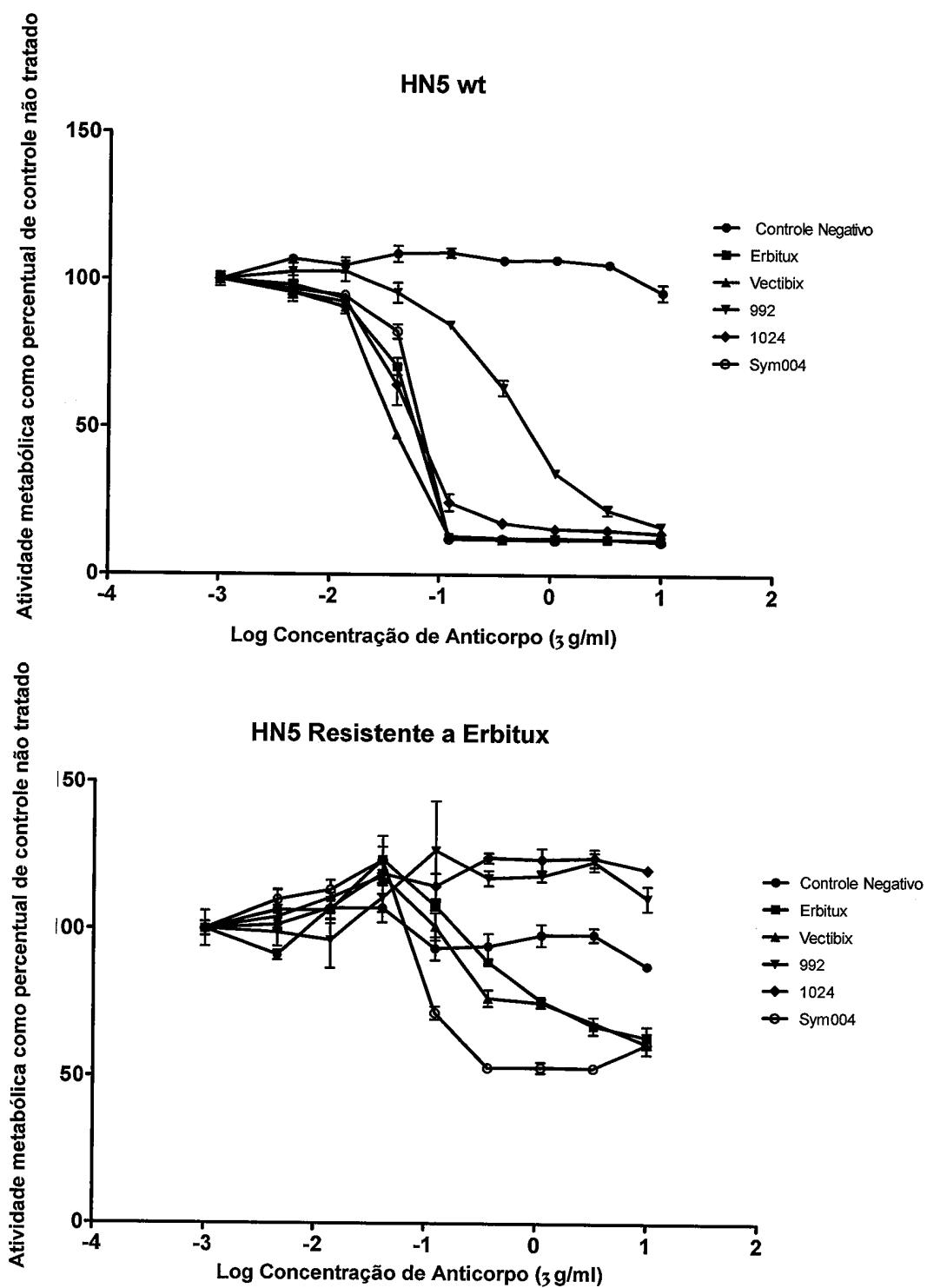


FIG. 43

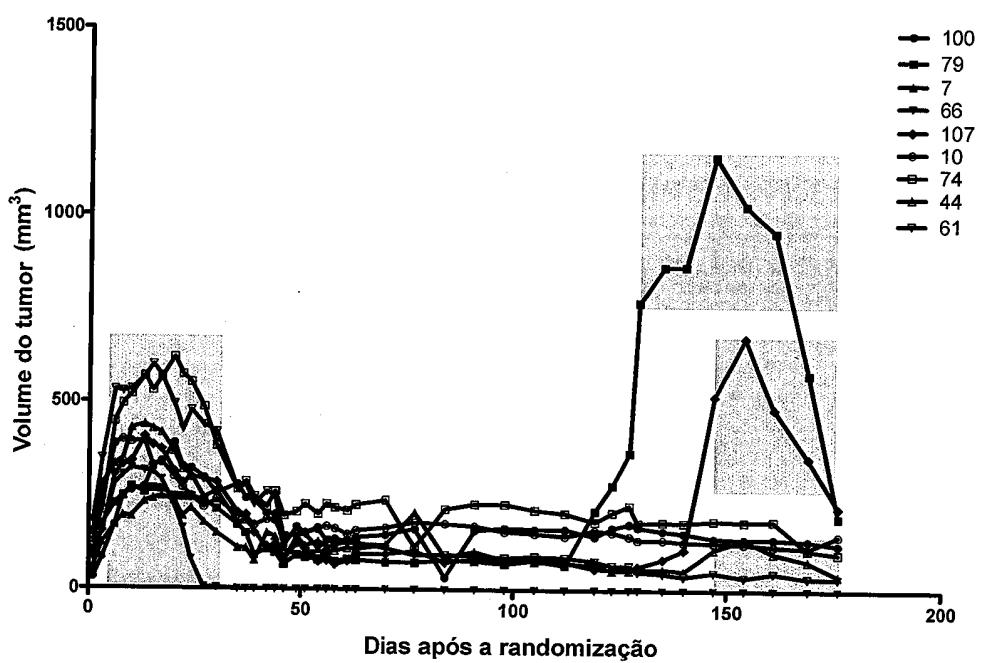


FIG. 44

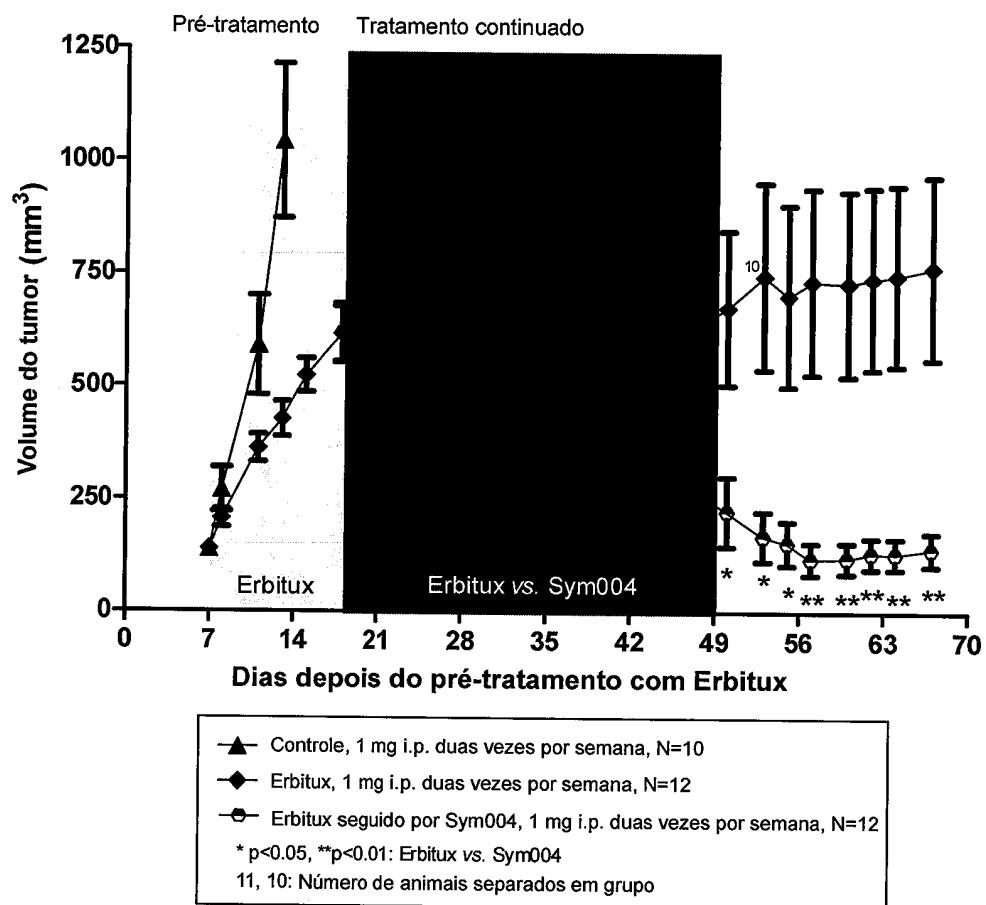


FIG. 45

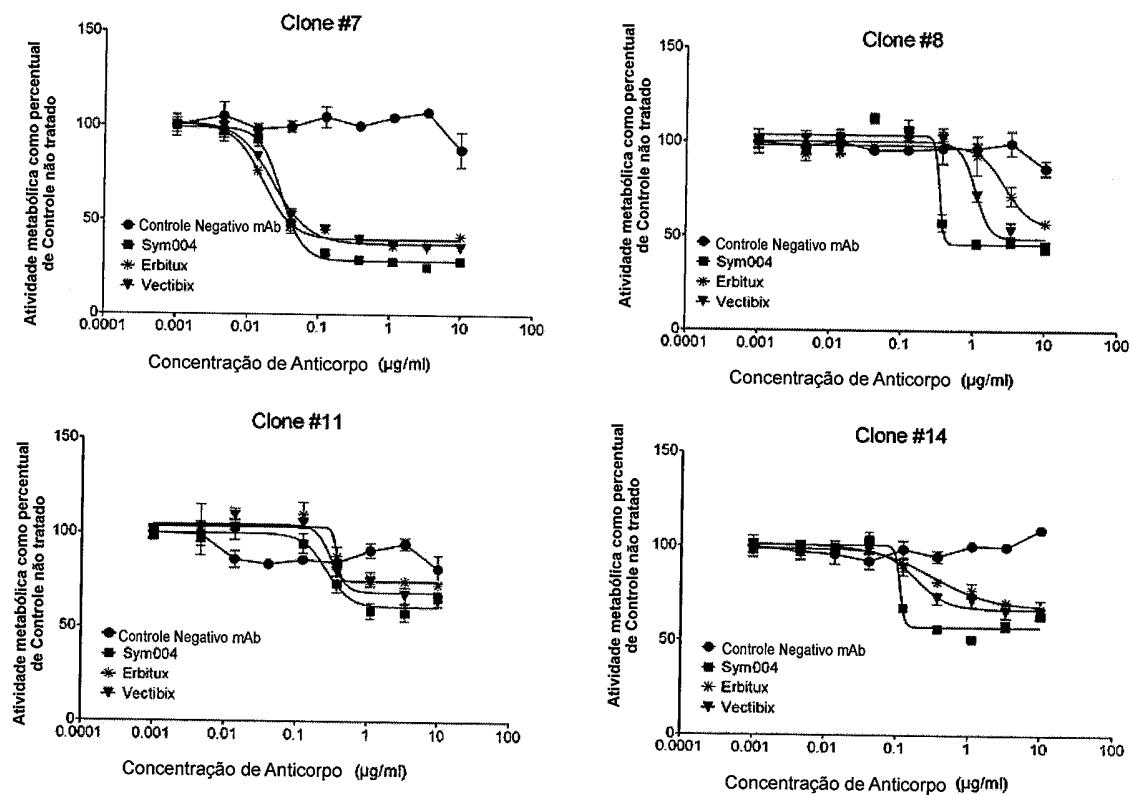


Fig.46

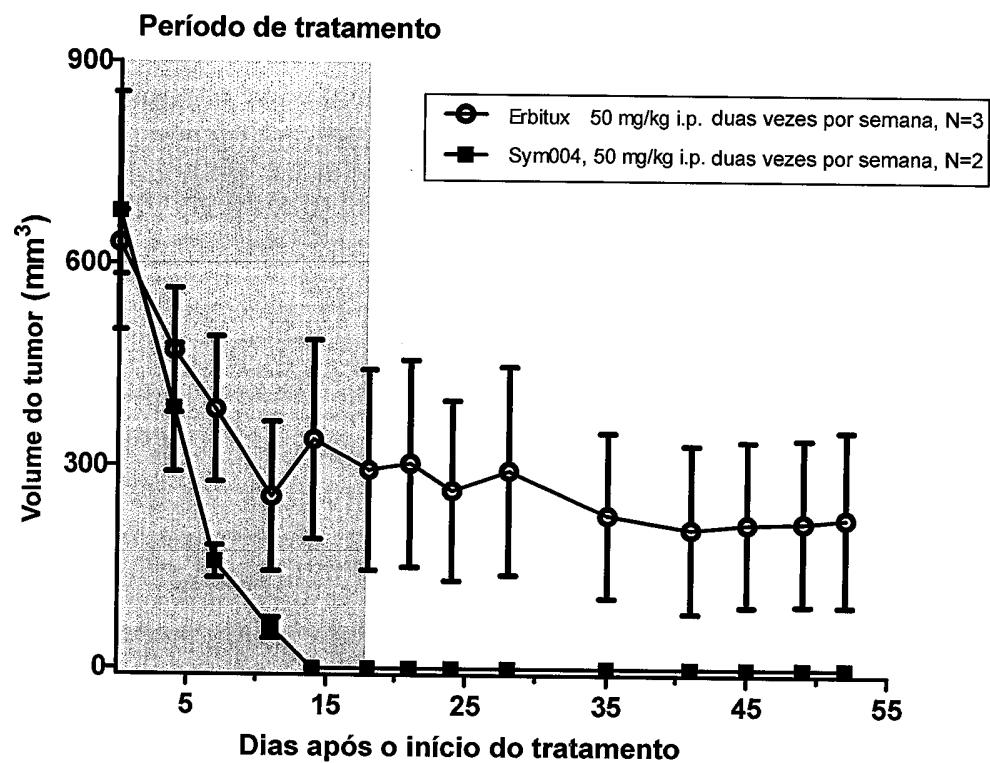


FIG. 47