

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.07.10	(73) Titular(es): PIERRE FABRE MEDICAMENT 45, PLACE ABEL GANGE 92100 BOULOGNE- BILLANCOURT FR
(30) Prioridade(s): 2007.07.12 EP 07301231 2007.07.12 US 929789 P 2008.01.11 US 20639 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.05.26	(72) Inventor(es): LILIANE GOETSCH FR
(45) Data e BPI da concessão: 2015.05.27 194/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **NOVOS ANTICORPOS QUE INIBEM A DIMERIZAÇÃO DE C-MET E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA A SELEÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-C-MET CAPAZES DE INIBIR A ATIVAÇÃO DEPENDENTE DE LIGANDO E INDEPENDENTE DE LIGANDO DE C-MET. MAIS PARTICULARMENTE, O REFERIDO PROCESSO É BASEADO NA INIBIÇÃO DA DIMERIZAÇÃO DE C-MET. EM OUTRO ASPECTO, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A TAIS ANTICORPOS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO TAIS ANTICORPOS PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAR CANCRO. PROCESSO DE DIAGNÓSTICO E KITS TAMBÉM SÃO PARTE DA INVENÇÃO.

RESUMO

**"NOVOS ANTICORPOS QUE INIBEM A DIMERIZAÇÃO DE c-MET E SUAS
UTILIZAÇÕES"**

A presente invenção refere-se a um processo para a seleção de anticorpos anti-c-Met capazes de inibir a ativação dependente de ligando e independente de ligando de c-Met. Mais particularmente, o referido processo é baseado na inibição da dimerização de c-Met. Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a tais anticorpos e composições compreendendo tais anticorpos para a preparação de um medicamento para tratar cancro. Processo de diagnóstico e kits também são parte da invenção.

DESCRIÇÃO**"NOVOS ANTICORPOS QUE INIBEM A DIMERIZAÇÃO DE c-MET E SUAS UTILIZAÇÕES"**CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a novos anticorpos capazes de se ligar especificamente ao recetor c-Met humano e/ou capaz de inibir especificamente a atividade de quinase de tirosina do referido recetor, especialmente anticorpos monoclonais originários de murino, quiméricos e humanizados, bem como as sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos. Mais particularmente, anticorpos de acordo com a invenção são capazes de inibir a dimerização de c-Met. A invenção, da mesma forma, compreende a utilização desses anticorpos como medicamento para o tratamento profilático e/ou terapêutico de cânceros e qualquer patologia relacionada à sobre-expressão do referido recetor, bem como em processos ou kits para diagnóstico de enfermidades relacionadas à sobre-expressão de c-Met. A invenção, finalmente, compreende produtos e/ou composições compreendendo tais anticorpos em combinação com outros anticorpos e/ou compostos químicos direcionados contra outros fatores de crescimento envolvidos em progressão ou metástase de tumor e/ou compostos e/ou agentes anticâncer ou agentes conjugados com toxinas e

sua utilização para a prevenção e/ou tratamento de determinados cancros.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Agentes direccionados à quinase de tirosina de recetor (RTK), tais como os inibidores trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib e gefitinib, têm ilustrado o interesse de direccionamento dessa classe de proteína para o tratamento de cancros seleccionados.

c-Met é o membro protótipo de uma subfamília de RTKs a qual também inclui RON e SEA. A família de RTK c-Met é estruturalmente diferente das outras famílias de RTK e é o único recetor de alta afinidade conhecido para o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), também denominado fator de dispersão (SF) [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10: 2867-2878]. c-Met e HGF são amplamente expressas em uma variedade de tecidos e sua expressão está normalmente restrita à células de origem epitelial e mesenquimal, respectivamente [M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6: 1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123: 223-235]. Elas são requeridas para desenvolvimento normal de mamíferos e foi mostrado que são particularmente importantes em migração celular, diferenciação morfogénica e organização das estruturas tubulares tridimensionais, bem como crescimento e angiogénese [F. Baldt et al., Nature 1995, 376: 768-771; C. Schmidt et al., Nature. 1995:

373:699-702; Tsarfaty et al., Science 1994, 263: 98-101]. Embora tenha sido mostrado que a regulação controlada de c-Met e HGF é importante no desenvolvimento, manutenção e reparo tecidual de mamíferos [Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., Brain Res. 2004, 5; 999(2): 155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., J Pharmacol Exp Ther. 2003, 307(1): 146-51], sua desregulação está envolvida na progressão de cânceros.

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

Ativação inapropriada de c-Met pode surgir através de mecanismos dependente de ligandos e independentes de ligandos, os quais incluem sobre-expressão de c-Met e/ou ativação parácrina ou autócrina ou obtendo uma mutação de função [J.G. Christensen, Burrows J. e Salgia R., Cancer Letters. 2005, 226: 1-26]. Contudo, uma oligomerização do recetor de c-Met, na presença ou ausência do ligando, é requerida para regular a afinidade de ligação e cinética de ligação da quinase com relação ao ATP e substratos peptídicos contendo tirosina [Hays JL, Watowich SJ, Biochemistry, 17 de Agosto de 2004, 43: 10570-8]. A c-Met ativada recruta efetadores de sinalização a seu sítio de

multiancoragem localizado no domínio citoplásmico, resultando na ativação de diversas vias de sinalização chave, incluindo Ras-MAPK, PI3K, Src e Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, Cell Res. 2005, 15(1): 49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene. 2000, 19(49): 5582-9]. Essas vias são essenciais para proliferação, invasão e angiogênese de células tumorais e para evasão de apoptose [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, Oncogene, 2000, 19(49): 5582-9; Gu H, Neel BG, Trends Cell Biol. Março de 2003, 13(3): 122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, Oncogene. 27 de Abril de 2000, 19(18): 2212-23]. Além disso, uma faceta única da sinalização de c-Met com relação à outras RTKs é sua interação reportada com complexos de adesão focal e parceiros de ligação de não-quinase, tais como integrinas $\alpha 6\beta 4$ [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, Cell. 2001, 107: 643-54], CD44v6 [Van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, J Biol Chem. 1999, 274(10): 6499-506], Plexina B1 ou semaforinas [Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9): 720-4; Conrotto P, Valdembrì D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, Blood. 2005, 105(11): 4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, Oncogene. 2004, 23: 5131-7], as quais podem ainda se somar à complexidade de regulação de função celular por esse recetor. Finalmente, dados recentes demonstram que a c-Met poderia estar envolvida em resistência do tumor ao

gefitinib ou erlotinib, sugerindo que combinações de compostos que objetivam o EGFR e c-Met poderiam ser de interesse significativo [Engelman JA et al., Science, 2007, 316: 1039-43].

Nos últimos anos, muitas estratégias diferentes foram desenvolvidas para atenuar a sinalização à c-Met em linhagens de células cancerígenas. Essas estratégias incluem i) neutralização de anticorpos contra c-Met ou HGF/SF [Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci US. 2001, 98(13): 7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, Clin Cancer Res. 2006, 12(20): 6144-52] ou a utilização do antagonista de HGF/SF, NK4, para prevenir ligação de ligando à c-Met [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60: 6737-43], ii) pequenos inibidores do sítio de ligação de ATP à c-Met que bloqueiam a atividade de quinase [Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63: 7345-55], iii) polipeptídeo com domínio SH2 manipulado que interfere com o acesso ao sítio de multiancoragem e RNAi ou ribozima que reduz a expressão do recetor ou ligando. A maioria dessas abordagens mostra uma inibição seletiva de c-Met, resultando em inibição de tumor e mostrando que c-Met poderia ser de interesse para intervenção terapêutica em cancro.

Dentro das moléculas geradas para direcionamento de c-Met, algumas são anticorpos gerados pela Genentech [W096/38557], os quais se comportam como um agonista potente quando adicionados isoladamente em vários modelos e como um antagonista quando usados como um fragmento Fab. Uma forma monovalente manipulada desse anticorpo descrita como 5D5 "one armed" (OA5D5) e produzida como uma proteína recombinante em *E. coli* é também o objeto de um pedido de patente [W02006/015371] pela Genentech. Contudo, essa molécula, que não pode ser considerada como um anticorpo em virtude de sua base particular, mostra também mutações que poderiam ser imunogénicas em seres humanos. Em termos de atividade, essa molécula não glicosilada é desprovida de funções efetadoras e, finalmente, não existe dados claros demonstrando que o OA5D5 inibe a dimerização de c-Met. Além disso, quando testado no modelo *in vivo* G55, uma linhagem de célula de glioblastoma que expressa c-Met, mas não mRNA e proteína de HGF e que cresce independentemente do ligando, o anti-c-Met "one armed" não teve efeito significativo sobre o crescimento do tumor G55, sugerindo que o OA5D5 atua primariamente através de bloqueio de ligação de HGF e não é capaz de direcionar tumores ativados independentemente de HGF [Martens T. et al., Clin. Cancer Res., 2006, 12(20): 6144-6152].

Outro anticorpo que direciona a c-Met é descrito pela Pfizer como um anticorpo que atua "predominantemente como antagonista de c-Met e, em alguns casos, como um

agonista de c-Met" [WO 2005/016382]. Nenhum dado mostrando qualquer efeito dos anticorpos da Pfizer sobre a dimerização de c-Met é descrito nesse pedido.

Um dos aspectos inovadores da presente invenção é gerar anticorpos monoclonais de ratinho sem atividade agonista intrínseca e inibição de dimerização de c-Met. Além de direcionamento de tumores dependente de ligandos, essa abordagem também confere ativações independente de ligandos de c-Met em virtude de sua sobre-expressão ou mutações dos domínios intracelulares os quais permaneceram dependentes de oligomerização para sinalização. Outro aspecto da atividade de tais anticorpos poderia ser um impedimento estérico para interação de c-Met com seus parceiros, que resultará em falha de funções de c-Met. Esses anticorpos serão, de preferência, humanizados e manipulados, mas não limitados a, como IgG1 humana para proporcionar funções efetuatoras, tais como ADCC e CDC, além de funções relacionadas ao bloqueio específico do recetor de c-Met.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Surpreendentemente, pela primeira vez, conseguiu-se gerar um anticorpo capaz de ligação à c-Met, mas também capaz de inibir a dimerização de c-Met. Se for verdade que, na técnica anterior, algumas vezes é sugerido que um anticorpo capaz de inibição da dimerização de c-Met com seus parceiros poderia ser interessante, nunca foi

divulgado ou claramente sugerido um anticorpo capaz de fazer isso. Além disso, com relação à especificidade do anticorpo, não era evidente de maneira alguma como proceder a geração de tal anticorpo ativo.

Um processo para a geração e seleção de anticorpos de acordo com a invenção é revelado no presente pedido de patente.

O processo para a seleção de um anticorpo anti-c-Met ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, capaz de inibir a ativação dependente de ligando e independente de ligando de c-Met, compreende as seguintes etapas:

i) rastreio dos anticorpos gerados e seleção de anticorpos capazes de se ligar especificamente à c-Met;

ii) avaliação *in vitro* dos anticorpos selecionados da etapa i) e seleção de anticorpos capazes de inibir pelo menos 50%, de preferência pelo menos 60%, 70% ou 80% da proliferação de células tumorais para pelo menos um tipo de tumor; e, então,

iii) testagem dos anticorpos selecionados da etapa ii) e seleção de anticorpos capazes de inibir a dimerização de c-Met.

Conforme foi explicado acima, a inibição da dimerização de c-Met é um aspecto capital da invenção, uma

vez que tais anticorpos representarão um interesse real por uma população maior de pacientes. Não apenas cancro c-Met-ativado dependente de ligando, conforme foi o caso para a presente invenção, mas também cancro c-Met-ativado independente de ligando poderia ser tratado com anticorpos gerados através do processo da presente invenção.

A geração do anticorpo pode ser realizada através de qualquer método conhecido por aqueles versados na técnica tal como, por exemplo, fusão de uma célula de mieloma com células de baço de ratinhos imunizados ou outras espécies compatíveis com as células de mieloma selecionadas [Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497]. Os animais imunizados poderiam incluir ratinhos transgênicos com *loci* de imunoglobulina humana os quais, então, produzem diretamente anticorpos humanos. Outra possível modalidade poderia consistir na utilização de tecnologias de *phage display* para selecionar bibliotecas.

A etapa de seleção i) pode ser realizada através de qualquer método ou processo conhecido por aqueles versados na técnica. Como exemplos não limitativos, podem ser mencionados ELISA, BIAcore, imuno-histoquímica, análise por FACS e seleções funcionais. Um processo preferido consiste em uma seleção através de ELISA sobre a proteína recombinante de c-Met e, então, através de análise por FACS sobre pelo menos uma linhagem de célula tumoral a fim de assegurar que os anticorpos produzidos serão capazes de reconhecer também o recetor nativo sobre células tumorais.

Esse processo será descrito mais precisamente nos exemplos a seguir.

Da mesma forma, a etapa ii) pode também ser realizada classicamente através de um método ou processo conhecido tal como, por exemplo, usando 3H-timidina ou qualquer outro agente de coloração de DNA, MTT, avaliação de ATP, etc. Um modelo de célula tumoral pode consistir no modelo BcPC3.

Por inibição da dimerização de c-Met, deve ser entendido, de preferência, a homodimerização de c-Met.

A referida etapa iii) de seleção do processo consiste em avaliação de anticorpos através de análise BRET sobre células expressando c-Met-RLuc/c-Met-YFP e seleção de anticorpos capazes de inibir pelo menos 30%, de preferência 35%, 40%, 45%, 50%, 55% e, mais preferivelmente, 60% da sinal de BRET.

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

A tecnologia BRET, usada na etapa iii) do processo, é bem-conhecida por aqueles versados na técnica e será detalhada nos exemplos a seguir. Mais particularmente, BRET (Transferência de Energia por Ressonância de Bioluminescência) é uma transferência de energia não radioativa

que ocorre entre um doador bioluminescente (Luciferase Renilla (Rluc)) e um aceitador fluorescente, um mutante de GFP (Proteína Fluorescente Verde) ou YFP (Proteína Fluorescente Amarela). No presente caso, EYFP (Proteína Fluorescente Amarela Intensificada) foi usada. A eficácia de transferência depende da orientação e da distância entre o doador e o aceitador. Então, a transferência de energia pode ocorrer apenas se as duas moléculas estiverem em proximidade íntima (1-10 nm). Essa propriedade é usada para gerar ensaios de interação proteína-proteína. Na verdade, de forma a estudar a interação entre dois parceiros, o primeiro é geneticamente fundido à Luciferase Renilla e o segundo ao mutante amarelo da GFP. Proteínas de fusão são, em geral, mas não obrigatoriamente, expressas em células de mamífero. Na presença de seu substrato membrana-permeável (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Se o mutante de GFP estiver mais próximo do que 10 nm da Rluc, uma transferência de energia pode ocorrer e um sinal amarelo adicional pode ser detectado. O sinal BRET é medido como a proporção entre a luz emitida pelo aceitador e a luz emitida pelo doador. Assim, o sinal BRET aumentará à medida que as duas proteínas de fusão são mantidas em proximidade ou se uma alteração conformacional mantiver Rluc e o mutante de GFP mais próximos.

Se a análise BRET consiste em uma modalidade preferida, qualquer método conhecido por aqueles versados na técnica pode ser usado para medir a dimerização de c-Met. Sem limitação, as seguintes tecnologias podem ser

mencionadas: FRET (Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência), HTRF (Fluorescência Tempo-Decomposta Homogênea), FLIM (Microscopia por Formação de Imagem por tempo de vida de Fluorescência) ou SW-FCCS (espectroscopia por relação cruzada de fluorescência com comprimento de onda único).

Outras tecnologias clássicas também poderiam ser usadas, tais como coimunoprecipitação, Alpha Screen, ligação cruzada química, Duplo Híbrido, Cromatografia por Afinidade, ELISA ou Western blot.

No presente pedido é revelado um anticorpo isolado ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, sendo obtidos através do referido processo. O referido anticorpo ou um de seus referidos fragmentos ou derivados é capaz de se ligar especificamente à c-Met humana e, se necessário, de preferência, além disso, capaz de inibir a fixação natural de seu ligando HGF e/ou capaz de inibir especificamente a atividade de quinase de tirosina da referida c-Met, o referido anticorpo sendo também capaz de inibir a dimerização de c-Met. Mais particularmente, os referidos anticorpos serão capazes de inibir a ativação dependente de ligando e independente de ligando de c-Met.

As expressões "fragmentos e derivados funcionais" serão definidas em detalhes depois na presente especificação.

Deve ser entendido aqui que a invenção não se refere aos anticorpos na forma natural, isto é, eles não estão em seu ambiente natural, mas eles foram capazes de ser isolados ou obtidos através de purificação a partir de fontes naturais ou mesmo obtidos através de recombinação genética ou através de síntese química e que eles podem, então, conter aminoácidos não-naturais, conforme será descrito aqui adiante.

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, o referido anticorpo sendo caracterizado compreender pelo menos uma região de determinação de complementaridade, CDR, escolhida de CDRs compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 1 a 17 e 56 a 61.

Um anticorpo ou fragmentos ou derivados tendo pelo menos uma CDR cuja sequência tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% e 98% de identidade, após alinhamento ótimo com as sequências SEQ ID NOS: 1 a 17 e 56 a 61 devem ser entendidos como um equivalente.

Por regiões de CDR ou CDR(s), se pretende indicar as regiões hipervariáveis das cadeias pesada e leve das imunoglobulinas, conforme definido pela IMGT.

A numeração única IMGT foi definida para comparar os domínios variáveis, seja qual for o recetor antigénico, o tipo de cadeia ou a espécie [Lefranc M.-P., Immunology

Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. e Lefranc, *Dev. Comp. Immunol*, 27, 55-77 (2003)]. Na numeração única IMGT, os aminoácidos conservados sempre têm a mesma posição, por exemplo, cisteína 23 (1^a-CYS), triptofano 41 (CONSERVADO-TRP), o aminoácido hidrofóbico 89, cisteína 104 (2^a-CYS), fenilalanina ou triptofano 118 (J-PHE ou J-TRP). A numeração única IMGT proporciona uma delimitação padronizada das regiões de estrutura principal (posições 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 e FR4-IMGT: 118 a 128) e das regiões de determinação de complementaridade: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 e CDR3-IMGT: 105 a 117. As lacunas representam posições desocupadas, os comprimentos das CDR-IMGT (mostradas entre colchetes e separadas por pontos, por exemplo, [8.8.13]) se tornam informação crucial. A numeração única IMGT é usada em representações gráficas 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. e Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002) /Kaas, Q. e Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)] e em estruturas 3D em IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. e Lefranc, M.-P., *T cell recetor e MHC structural data. Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Existem três CDRs de cadeia pesada e 3 CDRs de cadeia leve. O termo CDR ou CDRs é usado aqui de forma a indicar, de acordo com o caso, uma dessas regiões ou várias ou mesmo o todo dessas regiões, as quais contêm a maioria

dos resíduos de aminoácido responsáveis pela ligação por afinidade do anticorpo ao antígeno ou ao epítipo o qual elas reconhecem.

Por "percentagem de identidade" entre duas sequências de ácido nucleico ou aminoácido no sentido da presente invenção, pretende-se indicar uma percentagem de nucleotídeos ou resíduos de aminoácido idênticos entre as duas sequências a serem comparadas, obtidas após o melhor alinhamento (alinhamento ótimo), essa percentagem sendo puramente estatística e as diferenças entre duas sequências sendo distribuídas aleatoriamente e sobre todo o seu comprimento. As comparações de sequências entre duas sequências de ácido nucleico ou aminoácido são, tradicionalmente, realizadas comparando essas sequências após ter alinhado as mesmas de uma maneira ótima, a referida comparação sendo capaz de ser realizada por segmentos ou através de uma "janela de comparação". O alinhamento ótimo das sequências para a comparação pode ser realizado, além de manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2: 482], por meio do algoritmo de homologia local de Needleman e Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48: 443], por meio do método de busca por similaridade de Pearson e Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444], por meio de um software de computador usando esses algoritmos (LACUNA, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI ou mesmo através dos softwares de comparação BLAST N ou BLAST P).

A percentagem de identidade entre duas sequências de ácido nucleico ou aminoácido é determinada comparando essas duas sequências alinhadas de uma maneira ótima e na qual a sequência de ácido nucleico ou aminoácido a ser comparada pode compreender adições ou deleções com relação à sequência de referência para alinhamento ótimo entre essas duas sequências. A percentagem de identidade é calculada determinando o número de posições idênticas entre as duas sequências, dividindo-se esse número de posições idênticas pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando-se o resultado obtido por 100 de forma a obter a percentagem de identidade entre essas duas sequências.

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

Por sequência de aminoácidos tendo pelo menos

80%, de preferência 85%, 90%, 95% e 98% de identidade com uma sequência de aminoácidos de referência, são reveladas aquelas tendo, com relação à sequência de referência, determinadas modificações, em particular uma deleção, adição ou substituição de pelo menos um aminoácido, um truncamento ou um alongamento. No caso de uma substituição de um ou mais aminoácidos consecutivos ou não consecutivos, são preferidas substituições nas quais os aminoácidos substituídos são substituídos por aminoácidos "equivalentes". A expressão "aminoácidos equivalentes" se destina aqui a indicar qualquer aminoácido capaz de ser substituído por um dos aminoácidos da estrutura básica sem, contudo, modificar essencialmente as atividades biológicas dos anticorpos correspondentes e tal como será definido depois, especialmente nos exemplos. Esses aminoácidos equivalentes podem ser determinados contando com sua homologia estrutural com os aminoácidos os quais eles substituem ou resultados de exames comparativos de atividade biológica entre os diferentes anticorpos capazes de serem realizados.

À guisa de exemplo, menção é feita às possibilidades de substituição capaz de ser realizada sem resultar em uma modificação profunda da atividade biológica do anticorpo modificado correspondente.

Como um exemplo não limitativo, a tabela 1 a seguir proporciona possibilidades de substituição concebíveis com uma conservação da atividade biológica do anticorpo modificado. As substituições inversas, naturalmente, também são possíveis, nas mesmas condições.

Tabela 1

Resíduo original	Substituição(ões)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Deve ser entendido aqui que a invenção não se refere a anticorpos na forma natural, isto é, eles não estão em seu ambiente natural, mas que eles foram capazes

de serem isolados ou obtidos através de purificação a partir de fontes naturais ou mesmo obtidos através de recombinação genética ou através de síntese química e que eles podem, então, conter aminoácidos não-naturais, conforme será descrito aqui depois.

De acordo com uma primeira abordagem, o anticorpo será definido por sua sequência de cadeia pesada. Mais particularmente, o anticorpo da invenção ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais é caracterizado por compreender uma cadeia pesada compreendendo pelo menos uma CDR escolhida de CDRs compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID Nos. 1 a 9 e 56 a 58.

As sequências mencionadas são as seguintes:

SEQ ID No. 1:	GYIFTAYT
SEQ ID No. 2:	IKPNNGLA
SEQ ID No. 3:	ARSEITTEFDY
SEQ ID No. 4:	GYSFTDYT
SEQ ID No. 5:	INPYNGGT
SEQ ID No. 6:	AREEITKDFDF
SEQ ID NO: 7:	GYTFTDYN
SEQ ID NO: 8:	INPNNGGT
SEQ ID NO: 9:	ARGRYVGYYAMDY
SEQ ID NO: 56:	GYTFTSYW
SEQ ID NO: 57:	INPTTGST
SEQ ID NO: 58:	AIGGYGSWFAY

As CDRs da cadeia pesada poderiam ser escolhidas aleatoriamente nas sequências anteriores, isto é, SEQ ID NOs: 1 a 9 e 56 e 58.

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais compreendendo uma cadeia pesada compreendendo pelo menos uma CDR escolhida de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que:

- CDR-H1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 1, 4, 7 ou 56,
- CDR-H2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 2, 5, 8 ou 57 e
- CDR-H3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 3, 6, 9 ou 58.

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que CDR-H1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1, CDR-H2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 2 e CDR-H3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, de acordo com essa primeira modalidade compreendendo uma cadeia pesada de sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 18.

SEQ ID No. 18: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLG-
ESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSE-
ITTEFDYWGQGTALTIVSS

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que CDR-H1 compreende a sequência de aminoácidos e SEQ ID No. 4, CDR-H2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 5 e CDR-H3 compreende a sequência de aminoácidos e SEQ ID No. 6.

É descrito que o referido anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreenderá uma cadeia pesada da sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 19.

**SEQ ID No. 19: EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTLNWVKQSH
GKTLEWIGLINPYNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVY
YCAREEITKDFDFWGQGTTLTVSS**

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que CDR-H1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 7, CDR-H2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 8 e CDR-H3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 9.

É descrito que o referido anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreenderá uma cadeia pesada da sequência compreendendo a sequência aminoácido SEQ ID No. 20.

SEQ ID No. 20: EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSH
GMSLEWIGDINPNNGGTIFNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYY
CARGRYVGYYYAMDYWGQGTSVTVSS

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreendendo uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que CDR-H1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 56, CDR-H2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 57 e CDR-H3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 58.

É descrito que o referido anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreenderá uma cadeia pesada da sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 62.

SEQ ID No. 62:
QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGGLWIGYI
NPTTGSTDYNQKLKDKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAIGGYGSW
FAYWGQGTLLVTVSA

É descrito que o anticorpo será definido por sua sequência de cadeia leve. O referido anticorpo ou um de seus derivados ou fragmentos funcionais é caracterizado por compreender uma cadeia leve compreendendo pelo menos uma CDR escolhida de CDRs compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 10 a 17 e 59 a 61.

As sequências mencionadas são as seguintes:

SEQ ID No. 10	ESVDSYANSF
SEQ ID No. 11	RAS
SEQ ID No. 12	QQSKEDPLT
SEQ ID No. 13	ESIDTYGNSF
SEQ ID No. 14	QQSNEDPFT
SEQ ID No. 15	ENIYSN
SEQ ID No. 16	AAT
SEQ ID No. 17	QHFWGPPYT
SEQ ID No. 59	SSVSSTY
SEQ ID No. 60	TTS
SEQ ID No. 61	HQWSSYPFT

As CDRs da cadeia leve poderia ser escolhidas aleatoriamente nas sequências anteriores, isto é, SEQ ID Nos. 10 a 17 e 59 a 61.

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreendendo uma cadeia leve compreendendo pelo menos uma CDR escolhida de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que:

- CDR-L1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 10, 13, 15 ou 59,
- CDR-L2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 11, 16 ou 60 e

- CDR-L3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 12, 14, 17 ou 61.

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreende uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que CDR-L1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 10, CDR-L2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 11 e CDR-L3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 12.

É descrito que o referido anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreende uma cadeia leve da sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 21.

**SEQ ID No. 21: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQ
KPGQPPKLLIYRASNL ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSKE
DPLTFGSGTKLEMK**

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, que compreende uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que CDR-L1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 13, CDR-L2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 11 e CDR-L3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 14.

É descrito que o referido anticorpo compreenderá uma cadeia leve da sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 22.

SEQ ID No. 22: GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESIDTYGNSFIHWYQQKP
GQPPKLLIYRASNL ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDSATYYCQQSNEDPF
TFGSGTKLEMK

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, que compreende uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que CDR-L1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 15, CDR-L2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 16 e CDR-L3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 17.

É descrito que o referido anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreenderá uma cadeia leve da sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 23.

SEQ ID No. 23: DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGKSP
QLLVYAATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSYYCQHFHWGPPYTF
GGGTKLEIK

É descrito um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, que compreende uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que CDR-L1 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 59, CDR-L2 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 60 e CDR-L3 compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 61.

É descrito que o referido anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, compreenderá uma cadeia leve da sequência compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 63.

SEQ ID No. 63:

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTLTCSASSSVSSTLYWYQQKPGSSPKLWIYTTSL
ASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMETEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLDIK

É descrito um anticorpo que será definido por sua sequência de cadeia leve e sua sequência de cadeia pesada. O referido anticorpo ou um de seus derivados ou fragmentos funcionais, é caracterizado por ele compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 18, 19, 20 ou 62 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 21, 22, 23 ou 63.

Num primeiro aspecto a presente invenção é dirigida para um anticorpo isolado ou um de seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, denominado 224G11, caracterizado por o referido anticorpo compreender uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 1, 2 e 3; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 10, 11 e 12.

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo ou um de seus fragmentos divalentes com atividade de ligação a c-Met, é caracterizado por o referido anticorpo compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 18 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 21.

É revelado um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, de acordo com a invenção, denominado 227H1, que compreende uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 4, 5 e 6; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 13, 11 e 14.

É revelado que o referido anticorpo 227H1 compreende uma cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 19 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 22.

É revelado um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, denominado 223C4, que compreende uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 7, 8 e 9; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 compreendendo respectivamente a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 15, 16 e 17.

É revelado que o referido anticorpo 223C4 compreende uma cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 20 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 23.

É revelado um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais, denominado 11E1, que compreende

uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 56, 57 e 58; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 compreendendo respectivamente a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 59, 60 e 61.

É revelado que o referido anticorpo 11E1 compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 62 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 63.

A invenção refere-se ao hibridoma de murino capaz de secretar anticorpos monoclonais de acordo com a presente invenção, especialmente um hibridoma originário de murino, tal como depositado na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Coleção Nacional de Culturas de Micro-organismos) (Institut Pasteur, Paris, França).

A invenção refere-se ao hibridoma de murino capaz de secretar anticorpos monoclonais de acordo com a presente invenção, depositado na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Coleção Nacional de Culturas de Micro-organismos) (Institut Pasteur, Paris, França) em 14/03/2007 sob o número I-3731.

É descrito hibridoma de murino depositado no CNCM em 14/03/2007 sob os números CNCM 1-3724 (correspondendo a 11E1), 1-3732 (correspondendo a 227H1) e em 06/07/2007 sob

o número 1-3786 (correspondendo a 223C4). Esses hibridomas consistem em um hibridoma de murino resultando na fusão celular de esplenócitos de ratinho imunizado com uma linhagem de células de mieloma (Sp20 Ag14).

A tabela 2 a seguir reagrupa elementos referentes aos anticorpos.

Tabela 2

	224G11		227H1		223C4		11E1	
	1-3731		1-3732		1-3786		1-3724	
	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	Prot.	Nucl.	Prot.	Nucl.	Prot.	Nucl.	Prot.	Nucl.
CDR-H1	1	24	4	27	7	30	56	64
CDR-H2	2	25	5	28	8	31	57	65
CDR-H3	3	26	6	29	9	32	58	66
Cadeia P.	18	41	19	42	20	43	62	70
CDR-L1	10	33	13	36	15	38	59	67
CDR-L2	11	34	11	34	16	39	60	68
CDR-L3	12	35	14	37	17	40	61	69
Cadeia L.	21	44	22	45	23	46	63	71

A partir da tabela 2, está claro que CDR-L2 dos anticorpos 227H1 e 224G11 são similares. Esse exemplo sustenta a revelação de anticorpos compreendendo pelo menos uma CDR aleatoriamente escolhida das sequências de CDR descritas.

De acordo com uma modalidade preferida, a invenção refere-se a anticorpos monoclonais.

O termo "Anticorpo Monoclonal" é usado de acordo com seu significado comum para denotar um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto quanto às possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em quantidades mínimas. Em outras palavras, um anticorpo monoclonal consiste em um anticorpo homogêneo resultante da proliferação de um único clone de células (por exemplo, células de hibridoma, células hospedeiras eucariotas transfectadas com DNA que codifica o anticorpo homogêneo, células hospedeiras procariotas transformadas com o DNA que codifica o anticorpo homogêneo, etc.) e o qual é geralmente caracterizado por cadeias pesadas de um única classe e subclasse e cadeias leves de um único tipo. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único antígeno. Além disso, em contraste a preparações de anticorpos policlonais que, tipicamente, incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes ou epítipo, cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante sobre o antígeno.

Na presente descrição, os termos polipeptídeos, sequências polipeptídicas, sequências de aminoácidos, peptídeos e proteínas, com referência a compostos de anticorpo ou sua sequência, são permutáveis.

De acordo com um aspecto da mesma forma

particular, a presente invenção refere-se a um anticorpo quimérico ou um de seus fragmentos funcionais, de acordo com a invenção, caracterizado por o referido anticorpo, além disso, compreende as regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada derivadas de um anticorpo de uma espécie heteróloga ao ratinho, especialmente humano. É revelado que as regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada derivadas de um anticorpo humano são, respectivamente, a região Kappa e Gama-1, Gama-2 ou Gama-4.

No presente pedido, IgG1 são revelados para proporcionar funções efetuatoras e ADCC e CDC.

Aqueles habilitados reconhecerão que funções efetuatoras incluem, por exemplo, ligação a C1q; citotoxicidade dependente de complemento (CDC); ligação ao recetor Fc; citotoxicidade celular mediada depende de antígeno (ADCC); fagocitose; e sub-regulação de recetores na superfície celular (por exemplo, recetor de células de B; BCR).

Os anticorpos são, de preferência, anticorpos monoclonais específicos, especialmente originários de murino, quiméricos humanizados, os quais podem ser obtidos de acordo com métodos-padrão bem-conhecidos por aqueles versados na técnica.

Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos ou derivados funcionais,

especialmente originários de murino, é possível se referir a técnicas as quais são descritas, em particular, no manual "Antibodies" (Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, páginas 726, 1988) ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Kohler e Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975).

Os anticorpos monoclonais de acordo com a invenção podem ser obtidos, por exemplo, de uma célula animal imunizada contra c-Met ou um de seus fragmentos contendo o epítipo especificamente reconhecido pelos referidos anticorpos monoclonais de acordo com a invenção. A referida c-Met ou um de seus referidos fragmentos pode ser especialmente produzida de acordo com métodos de trabalho usuais, através de recombinação genética começando com uma sequência de aminoácidos contida na sequência de cDNA que codifica a c-Met ou através de síntese de peptídeo começando a partir de uma sequência de aminoácidos compreendida na sequência peptídica da c-Met.

Os anticorpos monoclonais de acordo com a invenção podem, por exemplo, ser purificados sobre uma coluna de afinidade sobre a qual a c-Met ou um de seus fragmentos contendo o epítipo especificamente reconhecido pelos referidos anticorpos monoclonais de acordo com a invenção foi previamente imobilizada. Mais particularmente, os referidos anticorpos monoclonais podem ser purificados através de cromatografia sobre proteína A e/ou G, seguido

ou não por cromatografia de troca iônica direcionada à eliminação dos contaminantes de proteína residual, bem como o DNA e a LPS em si, seguido ou não por cromatografia de exclusão sobre um gel de Sepharose™ de forma a eliminar os agregados potenciais em virtude da presença de dímeros ou outros multímeros. De uma maneira ainda mais preferida, o todo dessas técnicas pode ser usado simultânea ou sucessivamente.

Anticorpos quiméricos ou humanizados são, da mesma forma, incluídos nos anticorpos de acordo com a presente invenção.

Por anticorpo quimérico, entende-se um anticorpo o qual contém uma região variável natural (cadeia leve e cadeia pesada) derivado de um anticorpo de uma determinada espécie em combinação com as regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada de um anticorpo de uma espécie heteróloga à referida determinada espécie (por exemplo, ratinho, cavalo, coelho, cão, vaca, galinha, etc.).

Os anticorpos ou seus fragmentos do tipo quimérico de acordo com a invenção podem ser preparados usando as técnicas de recombinação genética. Por exemplo, o anticorpo quimérico pode ser produzido através de clonagem de um DNA recombinante contendo um promotor e uma sequência que codifica a região variável de um anticorpo monoclonal não-humano, especialmente de murino, de acordo com a invenção e uma sequência que codifica a região constante de

um anticorpo humano. Um anticorpo quimérico da invenção codificado por tal gene recombinante será, por exemplo, uma quimera de ratinho-homem, a especificidade desse anticorpo sendo determinada pela região variável do DNA de murino e seu isotipo determinado pela região constante derivada do DNA humano. Para os métodos de preparação de anticorpos quiméricos é possível, por exemplo, se referir aos documentos Verhoeyn et al. (BioEssays, 8: 74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6851-6855, 1984) ou le brevet US 4.816.567.

Por anticorpo humanizado, entende-se um anticorpo o qual contém regiões de CDR derivadas de um anticorpo de origem não-humana, as outras partes da molécula de anticorpo sendo derivadas de um (ou de vários) anticorpo humano. Além disso, alguns dos resíduos dos segmentos do esqueleto (denominado FR) podem ser modificados de forma a conservar a afinidade de ligação (Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeyn et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327, 1988).

Os anticorpos humanizados de acordo com a invenção ou seus fragmentos podem ser preparados através de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica (tais como, por exemplo, aqueles descritos nos documentos de Singer et al., J. Immun. 150: 2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; ou Bebbington et al., Bio/Technology, 10: 169-175, 1992).

Outros métodos de humanização são conhecidos por aqueles versados na técnica como, por exemplo, o método de "Enxertagem de CDR" descrito pela Protein Design Lab (PDL) nos pedidos de patente EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 ou US 5.530.101, US 6.180.370, US 5.585.089 e US 5.693.761. Os seguintes pedidos de patente também podem ser mencionados: US 5.639.641; US 6.054.297; US 5.886.152 e US 5.877.293.

Por "fragmento funcional" de um anticorpo de acordo com a invenção, entende-se, em particular, um fragmento de anticorpo, tais como fragmentos Fv, scFv (sc para um única cadeia), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diacorpos ou qualquer fragmento cujo tempo de meia-vida foi aumentado através de modificação química, tal como a adição de (poli)alquileno glicol, tal como (poli)etileno glicol ("PEGuilação") (fragmentos peguilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG ou Fab'-PEG) ("PEG" para Poli(Etileno) Glicol) ou através de incorporação em um lipossoma, os referidos fragmentos tendo pelo menos uma das CDRs característica de sequência SEQ ID Nos. 1 a 17 e 56 a 61 de acordo com a invenção e, especialmente, pelo facto de que ele é capaz de exercer, de uma maneira geral, uma atividade mesmo parcial do anticorpo do qual ele é derivado tal como, em particular, a capacidade de reconhecer e se ligar à c-Met e, se necessário, inibir a atividade da c-Met.

É revelado que os referidos fragmentos funcionais

serão constituídos ou compreenderão uma sequência parcial da cadeia variável pesada ou leve do anticorpo do qual eles são derivados, a referida sequência parcial sendo suficiente para reter a mesma especificidade de ligação que o anticorpo do qual ela é derivada e uma afinidade suficiente, pelo menos igual 1/100, ou pelo menos a 1/10 daquela do anticorpo do qual ela é derivada com relação à c-Met. Tal fragmento funcional conterá no mínimo 5 aminoácidos, de preferência 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 e 100 aminoácidos consecutivos da sequência do anticorpo do qual ela é derivada.

Estes fragmentos funcionais serão fragmentos do tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc ou diacorpos, os quais, em geral, têm a mesma especificidade de ligação que o anticorpo do qual eles são derivados. Estes fragmentos são selecionados dentre fragmentos divalentes, tais como fragmentos F(ab')₂. Fragmentos de anticorpo da invenção podem ser obtidos começando a partir de anticorpos, tal como descrito acima, através de métodos tais como digestão por enzimas tais como pepsina ou papaína e/ou através de clivagem das ligações em ponte de dissulfeto por meio de redução química. De outra maneira, os fragmentos de anticorpo compreendidos na presente invenção podem ser obtidos através de métodos de recombinação genética da mesma forma bem-conhecidos por aqueles versados na técnica ou mesmo através de síntese de peptídeo por meio, por exemplo, de sintetizadores automáticos de peptídeo, tais como aqueles fornecidos pela companhia Applied Biosystems, etc.

Por "fragmento divalente", entende-se quaisquer fragmentos de anticorpo compreendendo dois braços e, mais particularmente, fragmentos $F(ab')_2$.

A presente invenção revela anticorpos, especialmente anticorpos quiméricos ou humanizados obtidos através de recombinação genética ou através de síntese química.

Por "derivados" de um anticorpo de acordo com a invenção, entende-se uma proteína de ligação compreendendo uma base de proteína e pelo menos uma das CDRs selecionadas do anticorpo original de forma a manter a capacidade de ligação. Tais compostos são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica e serão descritos em maiores detalhes na especificação a seguir.

É descrito que o anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados com atividade de ligação a c-Met, de acordo com a invenção é caracterizado por o derivado consistir em uma proteína de ligação compreendendo uma base sobre a qual pelo menos uma CDR foi enxertada para a conservação das propriedades de reconhecimento paratópicas do anticorpo original.

Uma ou várias sequências das 6 sequências de CDR descritas na invenção podem estar presentes sobre uma base de proteína. Nesse caso, a base de proteína reproduz a parte principal de proteína com uma duplicação apropriada

da(s) CDR(s) enxertada(s), assim, permitindo que as mesmas mantenham suas propriedades de reconhecimento paratópicas do antígeno.

Aqueles versados na técnica saberão como selecionar a base de proteína sobre a qual pelo menos uma CDR selecionada do anticorpo original poderia ser enxertada. Mais particularmente, sabe-se que, para ser selecionada, tal base deverá mostrar várias características, como segue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

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

Tal base de proteína pode ser, mas sem limitação, uma estrutura selecionada do grupo consistindo em fibronectina e, de preferência o décimo domínio de fibronectina do tipo III (FNfn10), lipocalina, anticalina (Skerra A., J.

Biotechnol, 2001, 74(4): 257-75), o derivado de proteína Z do domínio B de proteína A estafilocócica, tioredoxina A ou qualquer proteína com domínio repetido, tal como "repetição de anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), "repetição de armadilo", "repetição rica em leucina" ou "repetição de tetratricopeptídeo".

Também poderia ser mencionado um derivado de base de toxinas (tal como, por exemplo, toxinas de escorpião, inseto, planta ou molusco) ou inibidores de proteína de sintase de óxido nítrico neuronal (PIN).

Como um exemplo não limitativo de tais construções híbridas pode ser mencionada a inserção da CDR-H1 (cadeia pesada) de um anticorpo anti-CD4, isto é, o anticorpo 13B8.2, em um dos loops expostos da PIN. As propriedades de ligação da proteína de ligação obtida permanecem similares ao anticorpo original (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). Também pode ser mencionada o enxerto da CDR-H3 (cadeia pesada) de um anticorpo antilisozima VHH sobre um "loop" da neocarzinostatina (Nicaise et al., 2004).

No caso do presente pedido, uma CDR interessante a ser conservada poderia ser, sem limitação, CDR-L2, uma vez que ela é conservada em dois anticorpos idênticos da invenção, isto é, 227H1 e 224G11.

Conforme mencionado acima, tal base de proteína

pode compreender de 1 a 6 CDR(s) do anticorpo original. Em uma modalidade preferida, mas sem qualquer limitação, aqueles versados na técnica poderiam selecionar pelo menos uma CDR da cadeia pesada, a referida cadeia pesada sendo conhecida por estar particularmente envolvida na especificidade do anticorpo. A seleção da(s) CDR(s) será evidente para aqueles versados na técnica através de um método conhecido (BES et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Como uma evidência, esses exemplos não são limitativos e qualquer outra base conhecida ou descrita deve ser incluída na presente especificação.

De acordo com um novo aspecto, a presente invenção refere-se um ácido nucleico isolado, caracterizado por ele é escolhida dos ácido nucleicos a seguir:

a) um ácido nucleico, DNA ou RNA, que codifica um anticorpo ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, de acordo com a invenção;

b) um ácido nucleico compreendendo uma sequência de DNA compreendendo a sequência CDR-H1 SEQ ID No. 24, a sequência CDR-H2 SEQ ID No. 25, a sequência CDR-H3 SEQ ID No. 26 e a sequência CDR-L1 SEQ ID No. 33, a sequência CDR-L2 SEQ ID No. 34 e a sequência CDR-L3 SEQ ID No. 35;

c) um ácido nucleico compreendendo a sequência de DNA compreendendo a sequência de cadeia pesada SEQ ID No. 41 e a sequência de cadeia leve SEQ ID No. 44;

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

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

Por ácido nucleico, nucleico ou sequência de ácidos nucleicos, polinucleotídeo, oligonucleotídeo, sequência de polinucleotídeo, sequência de nucleotídeo, termos os quais serão empregados indiferentemente na presente invenção, entende-se uma ligação precisa de nucleotídeos, a qual pode ser modificada ou não modificada, que permite que um fragmento ou uma região de um ácido nucleico seja definida, contendo ou não contendo nucleotídeos não-naturais e sendo capaz de corresponder a um DNA de dupla cadeia, um DNA de cadeia simples, bem como aos produtos de transcrição dos referidos DNAs.

Deve também ser entendido aqui que a presente invenção não se refere à sequências de nucleotídeo em seu ambiente cromossômico natural, isto é, no estado natural. Ela refere-se à sequências as quais foram isoladas e/ou purificadas, isto é, elas foram selecionadas direta ou indiretamente, por exemplo, através de cópia, seu ambiente tendo sido pelo menos parcialmente modificado. Assim, da mesma forma, ela se destina a indicar aqui os ácidos nucleicos isolados obtidos através de recombinação genética, por exemplo, por meio de células hospedeiras ou obtidos através de síntese química.

Uma hibridização sob condições de alta estrin-
gência significa que as condições de temperatura e
condições de resistência iônica são escolhidas de uma forma
tal que elas permitem a manutenção da hibridização entre
dois fragmentos de DNA complementar. À guisa de ilustração,
condições de alta estrinência da etapa de hibridização
para fins de definição dos fragmentos de polinucleotídeo
descritos acima são, vantajosamente, as seguintes.

A hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA é realizada
em duas etapas: (1) pré-hibridização a 42°C durante 3 horas
em tampão de fosfato (a 20 mM, pH de 7,5) contendo 5 x SSC
(1 x SSC corresponde a NaCl a 0,15 M + solução de citrato
de sódio a 0,015 M), 50 % de formamida, 7 % de
dodecilsulfato de sódio (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de
sulfato de dextrano e 1 % de DNA de esperma de salmão; (2)
hibridização real durante 20 horas em uma temperatura
dependente do tamanho da sonda (isto é : 42°C, para um
tamanho de sonda > 100 nucleotídeos) seguido por 2 lavagens
de 20 minutos a 20°C em 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavagem de
20 minutos a 20°C em 0,1 x SSC + 0,1 % de SDS. A última
lavagem é realizada em 0,1 x SSC + 0,1 % de SDS durante 30
minutos a 60°C para um tamanho de sonda > 100 nucleotídeos.
As condições de hibridização de alta estrinência descritas
acima para um polinucleotídeo de tamanho definido podem ser
adaptadas por aqueles versados na técnica para
oligonucleotídeos de maior ou menor tamanho, de acordo com
o ensinamento de Sambrook et al. (1989, Molecular cloning:
a laboratory manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor).

A invenção, da mesma forma, refere-se a um vetor compreendendo um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

A invenção direciona especificamente a vetores de clonagem e/ou vetores de expressão, os quais contêm uma sequência de nucleotídeo de acordo com a invenção.

É revelado que vetores contêm elementos os quais permitem a expressão e/ou a secreção das sequências de nucleotídeo em uma determinada célula hospedeira. O vetor deve, portanto, conter um promotor, sinais de início e término de tradução, bem como regiões apropriadas de regulação de transcrição. Ele deve ser capaz de ser mantido de uma maneira estável na célula hospedeira e pode, opcionalmente, ter sinais particulares os quais especificam a secreção da proteína traduzida. Esses diferentes elementos são escolhidos e otimizados por aqueles versados na técnica como uma função da célula hospedeira usada. Para esse efeito, as sequências de nucleotídeo de acordo com a invenção podem ser inseridas em vetores de reprodução autônoma no hospedeiro escolhido ou ser vetores integrativos do hospedeiro escolhido.

Tais vetores são preparações através de métodos atualmente usados por aqueles versados na técnica e os clones resultantes podem ser introduzidos em um hospedeiro apropriado através de métodos-padrão, tais como lipofecção, eletroporação, choque térmico ou métodos químicos.

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

A invenção, da mesma forma, compreende as células hospedeiras transformadas por ou compreendendo um vetor de acordo com a invenção.

A célula hospedeira pode ser escolhida de sistemas procariotas ou eucariotas, por exemplo, células bacterianas mas, da mesma forma, células de levedo ou células animais, em particular células de mamífero. Da mesma forma, é possível usar células de inseto ou células de planta.

A invenção, da mesma forma, refere-se a animais, exceto o homem, os quais compreendem pelo menos uma célula transformada de acordo com a invenção.

De acordo com outro aspecto, um objeto da invenção é um processo para a produção de um anticorpo ou um de seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met de acordo com a invenção, caracterizado por ele compreende os seguintes estágios:

a) cultura em um meio e condições de cultura

apropriadas de uma célula hospedeira de acordo com a invenção; e

b) a recuperação dos referidos anticorpos ou um de seus fragmentos funcionais assim produzidos começando a partir do meio de cultura ou das referidas células cultivadas.

As células transformadas de acordo com a invenção podem ser usadas em processos para preparação de polipeptídeos recombinantes de acordo com a invenção. Os processos para preparação de um polipeptídeo de acordo com a invenção na forma recombinante, caracterizado por eles empregam um vetor e/ou uma célula transformada por um vetor de acordo com a invenção são, em si, compreendidos na presente invenção. De preferência, uma célula transformada por um vetor de acordo com a invenção é cultivada sob condições as quais permitem a expressão do referido polipeptídeo e o referido peptídeo recombinante é recuperado.

Conforme foi dito, a célula hospedeira pode ser escolhida de sistemas procariotas ou eucariotas. Em particular, é possível identificar sequências de nucleotídeo de acordo com a invenção que facilitam a secreção em tal sistema procariota ou eucariota. Um vetor de acordo com a invenção trazendo tal sequência pode, portanto, vantajosamente, ser usado para a produção de proteínas recombinantes destinadas a serem secretadas. Na realidade, a purificação dessas proteínas recombinantes de interesse

será facilitada pelo facto de que elas estão presentes no sobrenadante da cultura de célula ao invés de no interior das células hospedeiras.

Da mesma forma, é possível preparar os polipeptídeos de acordo com a invenção através de síntese química. Tal processo de preparação é, da mesma forma, um objeto da invenção. Aqueles versados na técnica conhecerão os processos de síntese química, por exemplo, as técnicas empregando fases sólidas [Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^a ed., (1984)] ou técnicas usando fases sólidas parciais, através de condensação de fragmentos ou através de uma síntese clássica em solução. Os polipeptídeos obtidos através de síntese química e sendo capazes de conter aminoácidos não-naturais correspondentes são, da mesma forma, compreendidos na invenção.

São revelados anticorpos ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais capazes de serem obtidos através de um processo de acordo com a invenção.

A invenção também refere-se ao anticorpo da invenção para utilização como medicamento.

É descrita uma composição farmacêutica compreendendo, como forma de princípio ativo, um composto consistindo em um anticorpo ou um de seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção, de preferência, misturado com um excipiente e/ou um veículo farmaceuticamente aceitável.

Outra modalidade complementar da invenção consiste em uma composição tal como descrito acima a qual compreende, além disso, como um produto de combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial, um anticorpo antitumoral.

O referido segundo anticorpo antitumoral poderia ser escolhido de anticorpos anti-IGF-IR, anti-EGFR, anti-HER2/neu, anti-VEGFR, anti-VEGF, etc., ou quaisquer outros anticorpos antitumorais conhecidos por aqueles versados na técnica. É revelada a utilização, como segundo anticorpo, de fragmentos ou derivados funcionais dos anticorpos mencionados acima.

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

"Utilização simultânea" deve ser entendido como significando a administração dos dois compostos da composição de acordo com a invenção em uma forma farmacêutica única e idêntica.

"Utilização separada" deve ser entendido como significando a administração, ao mesmo tempo, dos dois compostos da composição de acordo com a invenção em formas farmacêuticas distintas.

"Utilização sequencial" deve ser entendido como significando a administração sucessiva dos dois compostos da composição de acordo com a invenção, cada um em uma forma farmacêutica distinta.

De um modo geral, a composição de acordo com a invenção aumenta consideravelmente a eficácia do tratamento de cancro. Em outras palavras, o efeito terapêutico dos anticorpos anti-c-Met de acordo com a invenção é potencializado de uma maneira inesperada através da administração de um agente citotóxico. Outra principal subsequente vantagem produzida por uma composição de acordo com a invenção refere-se à possibilidade de utilização de menores doses eficazes de princípio ativo, o que permite os riscos de aparecimento de efeitos secundários sejam evitados ou sejam reduzidos, em particular os efeitos do agente citotóxico.

Além disso, essa composição de acordo com a invenção permitirá que o efeito terapêutico esperado seja obtido mais rapidamente.

A composição da invenção também pode ser caracterizada pelo facto de que ela compreende, além disso, como um produto de combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial, um agente citotóxico/citostático.

Por "agentes terapêuticos anticancro" ou "agentes citotóxicos/citostáticos" entende-se uma substância a qual,

quando administrada a um indivíduo, trata ou previne o desenvolvimento de cancro no corpo do indivíduo. Como um exemplo não limitativo de tais agentes, podem ser mencionados agentes de alquilação, anti-metabolitos, antibióticos antitumor, inibidores mitóticos, inibidores de função de cromatina, agentes antiangiogénese, antiestrogénios, antiandrogénios ou imunomoduladores.

Tais agentes são, por exemplo, citados na edição de 2001 de VIDAL, na página destinada aos compostos relacionados à coluna de cancerologia e hematologia "Citotóxicos", esses compostos citotóxicos citados por referência a esse documento são citados aqui como agentes citotóxicos preferidos.

São citados os seguintes agentes.

"Agente de alquilação" refere-se a qualquer substância a qual pode se reticular ou alquilar qualquer molécula, de preferência. ácido nucleico (por exemplo, DNA), dentro de uma célula. Exemplos de agente de alquilação incluem mostarda de azoto, tal como mecloretamina, clorambucol, melfaleno, cloridrato, pipobromeno, prednimustina, fosfato dissódico ou estramustina; oxazoforinas, tais como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida ou ifosfamida; aziridinas ou imina-etilenos, tais como, tiotepa, trietilenamina ou altetramina; nitrosourea, tal como carmustina, estreptozocina, fotemustina ou lomustina; sulfonatos de alquila, tais como, bussulfano, treossulfano

ou imbossulfano; triazenos, tal como dacarbazina; ou complexos de platina, tais como cis-platina, oxaliplatina e carboplatina.

"Anti-metabolitos" refere-se à substâncias que bloqueiam o crescimento celular e/ou metabolismo através de interferência com determinadas atividades, usualmente síntese de DNA. Exemplos de anti-metabolitos incluem metotrexato, 5-fluoruracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, arabinosídeo de citosina, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, deóxicoformicina e pentostatina.

"Antibióticos antitumor" refere-se a compostos os quais podem prevenir ou inibir a síntese de DNA, RNA e/ou proteína. Exemplos de antibióticos antitumor incluem doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina e procarbazona.

"Inibidores mitóticos" impedem a progressão normal do ciclo celular e mitose. Em geral, inibidores de microtúbulo ou taxoides, tais como paclitaxel e docetaxel são capazes de inibir a mitose. Alcaloides vinca, tais como vinblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina, também são capazes de inibir a mitose.

"Inibidores da função de cromatina" ou "inibi-

dores de topoisomerase" refere-se a substâncias as quais inibem a função normal de proteínas de modelamento de cromatina, tais como topoisomerase I ou topoisomerase II. Exemplos de inibidores de função de cromatina incluem, para topoisomerase I, camptotecina e seus derivados, tais como topotecano ou irinotecano e, para topoisomerase II, etoposídeo, fosfato de etoposídeo e teniposídeo.

"Agente antiangiogénese" refere-se a qualquer fármaco, composto, substância ou agente o qual inibe o crescimento de vasos sanguíneos. Agentes antiangiogénese exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, esqualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferon-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina e vitaxina.

"Antiestrogénio" ou "agente antiestrogénico" refere-se a qualquer substância a qual reduz, antagozina ou inibe a ação do estrogénio. Exemplos de agentes antiestrogénio são tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozola, letrozole e exemestano.

"Antiandrogénios" ou "agente antiandrogénio" refere-se a qualquer substância a qual reduz, antagoniza ou inibe a ação de um androgénio. Exemplos de antiandrogénio são flutamida, nilutamida, bicalutamida, esprironolactona, acetato de ciproterona, finasterida e cimitidina.

"Imunomoduladores" são substâncias as quais estimulam o sistema imune. Exemplos de imunomoduladores incluem, interferon, interleucina, tal como aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox e interleucina-2, fatores de necrose tumoral, tal como tasonermina ou outros moduladores, tais como lentinano, sizofirano, roquinimex, pidotimod, pegademase, timopentina, poli I:C ou levamisola em conjunto com 5-fluorouracila.

Para maiores detalhes, aqueles versados na técnica poderiam se referir ao manual editado pela the "Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique" e intitulado "Traité de chimie thérapeutique, vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edição TEC & DOC, 2003".

Também podem ser mencionados como agentes químicos ou agentes citotóxicos todos os inibidores de quinase tais como, por exemplo, gefitinib ou erlotinib.

É revelado que a referida composição como um produto de combinação de acordo com a invenção é caracterizada pelo facto de que o referido agente citotóxico é acoplado quimicamente ao referido anticorpo para utilização simultânea.

De forma a facilitar o acoplamento entre o referido agente citotóxico e o referido anticorpo de acordo

com a invenção, é especialmente possível introduzir moléculas espaçadoras entre os dois compostos a serem acoplados, tais como (poli)alquileno glicóis, tal como polietileno glicol ou mesmo aminoácidos ou, em outra modalidade, usar derivados ativos dos referidos agentes citotóxicos nos quais foram introduzidas funções capazes de reação com o referido anticorpo de acordo com a invenção. Esses métodos de acoplamento são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica e não serão expandidos na presente descrição.

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

A referida toxina ou o referido radioelemento é capaz de inibir pelo menos uma atividade celular de células expressando a c-Met, de uma maneira mais preferida capaz de prevenir o crescimento ou a proliferação da referida célula, especialmente de inativar totalmente a referida célula.

É revelado que a referida toxina é uma toxina enterobacteriana, especialmente exotoxina A de *Pseudomonas*.

Os radioelementos (ou radioisótopos), de preferência conjugados aos anticorpos empregados para a terapia,

são radioisótopos os quais emitem raios gama e, de preferência, iodo¹³¹, ítrio⁹⁰, ouro¹⁹⁹, paládio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ e antimônio²¹¹. Os radioisótopos os quais emitem raios beta e alfa podem, da mesma forma, ser usados para a terapia.

Por toxina ou radioelemento conjugado a pelo menos um anticorpo ou um de seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção, entende-se qualquer meio que permite que a referida toxina ou o referido radioelemento se liguem ao referido pelo menos um anticorpo, especialmente através de acoplamento covalente entre os dois compostos, com ou sem a introdução de uma molécula de ligação.

Dentre os agentes que permitem a ligação de uma maneira química (covalente), eletroestática ou não-covalente de todos ou parte dos componentes do conjugado, menção pode ser particularmente feita a benzoquinona, carbodiimida e mais particularmente EDC (cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), tioacetato de N-succinimidil S-acetila (SATA), os agentes de ligação em ponte tendo um ou mais grupos fenilazida que reagem com raios ultravioleta (U.V.) e, de preferência, N-[-4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2-piridilditio)-propionamida (APDP), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidila (SPDP), 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Outra forma de acoplamento, especialmente para os

radioelementos, pode consistir na utilização de um quelante de iões bifuncional.

Dentre esses quelatos, é possível mencionar os quelatos derivados de EDTA (ácido etilenodiaminatetra-acético) ou de DTPA (ácido dietilenetriaminapenta-acético), os quais foram desenvolvidos para ligação de metais, especialmente metais radioativos e imunoglobulinas. Assim, DPA e seus derivados podem ser substituídos por diferentes grupos sobre a cadeia de carbono de forma a aumentar a estabilidade e a rigidez do complexo de ligando-metal (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); Patente US 4.831.175).

Por exemplo, ácido dietilenotriaminapenta-acético (DTPA) e seus derivados, os quais têm sido usados amplamente em medicina e em biologia há muito tempo em sua forma livre ou na forma de um complexo com um ião metálico, tem a característica acentuada de formação de quelatos estáveis com iões metálicos e de ser acoplado com proteínas de interesse terapêutico ou diagnóstico, tais como anticorpos para o desenvolvimento de radioimunoconjugados em terapia de cancro (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

É revelado que o referido pelo menos um anticorpo que forma o referido conjugado de acordo com a invenção é escolhido de seus fragmentos funcionais, especialmente dos fragmentos com deleção de seu componente Fc, tais como os fragmentos scFv.

É revelado que o referido agente citostático/citotóxico e a referida toxina e/ou um radioelemento é acoplado quimicamente a pelo menos um dos elementos da referida composição para utilização simultânea.

A presente invenção compreende a composição descrita para utilização como medicamento.

A presente invenção compreende, além disso, a utilização da composição de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento.

No presente pedido é revelada a utilização de um anticorpo ou um de seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met e/ou de uma composição conforme descrito acima para a preparação de um medicamento destinado a inibir o crescimento e/ou a proliferação de células tumorais.

Outro aspecto da invenção consiste na utilização de um anticorpo ou um de seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met e/ou de uma composição conforme descrito acima ou da utilização mencionada acima para a preparação de um medicamento destinado à prevenção ou ao tratamento de cancro.

É também revelado no presente pedido um método destinado a inibir o crescimento e/ou a proliferação de células tumorais em um paciente compreendendo a

administração, a um paciente que precisa do mesmo, de um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais de acordo com a invenção, de um anticorpo produzido através de um hibridoma de acordo com a invenção ou uma composição de acordo com a invenção.

O presente pedido descreve ainda um método para a prevenção ou o tratamento de cancro em um paciente que precisa do mesmo compreendendo a administração, ao paciente, de um anticorpo ou um de seus fragmentos ou derivados funcionais de acordo com a invenção, de um anticorpo produzido por um hibridoma de acordo com a invenção ou uma composição de acordo com a invenção.

Em um aspecto preferido particular, o referido cancro é um cancro escolhido de cancro de próstata, osteosarcomas, cancro de pulmão, cancro de mama, cancro endometrial, glioblastoma ou cancro de cólon.

Conforme explicado antes, uma vantagem da invenção é permitir o tratamento de cancros relacionados à ativação de Met dependentes e independentes de HGF.

A invenção, em ainda outro aspecto, abrange um método de diagnóstico *in vitro* de enfermidades induzidas por uma sobre-expressão ou uma subexpressão do recetor de c-Met começando a partir de uma amostra biológica na qual a presença anormal do recetor de c-Met é suspeita, o referido método sendo caracterizado por ele compreende uma etapa em

que a referida amostra biológica é contactada com um anticorpo da invenção, sendo possível que o referido anticorpo seja, se necessário, marcado.

É descrito que a referida enfermidade está relacionada com a presença anormal do recetor de c-Met no referido método diagnóstico será cancro.

O referido anticorpo ou um de seus fragmentos funcionais pode estar presente na forma de um imunoconjugado ou de um anticorpo marcado, de modo a obter um sinal detectável e/ou quantificável.

Os anticorpos marcados de acordo com a invenção ou seus fragmentos funcionais incluem, por exemplo, anticorpos denominados imunoconjugados os quais podem ser conjugados, por exemplo, com enzimas tais como peroxidase, fosfatase alcalina, beta-D-galactosidase, glicose oxidase, glicose amilase, anidrase carbónica, acetilcolinesterase, lisozima, malato desidrogenase ou glicose 6-fosfato desidrogenase ou por uma molécula, tal como biotina, digoxigenina ou 5-bromodesoxiuridina. Marcadores fluorescentes podem, da mesma forma, ser conjugados aos anticorpos ou seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção e incluem especialmente fluoresceína e seus derivados, fluorocromo, rodamina e seus derivados, GFP (GFP para "Proteína Fluorescente Verde"), dansilo, unbeliferona, etc. Em tais conjugados, os anticorpos da invenção ou seus fragmentos funcionais podem ser preparados através de métodos

conhecidos por aqueles versados na técnica. Eles podem ser acoplados a enzimas ou aos marcadores fluorescentes diretamente ou por intermédio de um grupo espaçador ou de um grupo de ligação, tal como um polialdeído, tal como glutaraldeído, ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), ácido dietilenotriaminopenta-acético (DPTA) ou na presença de agentes de acoplamento, tais como aqueles mencionados acima para os conjugados terapêuticos. Os conjugados contendo marcadores do tipo fluoresceína podem ser preparados através de reação com um isotilcianato.

Outros conjugados podem, da mesma forma, incluir marcadores quimioluminescentes, tais como luminol e os dioxetanos, marcadores bioluminescentes, tais como luciferase e luciferina ou mesmo marcadores radioativos, tais como iodo¹²³, iodo¹²⁵, iodo¹²⁶, iodo¹³³, bromo, tecnécio^{99m}, índio¹¹¹, índio^{113m}, gálio⁶⁷, gálio⁶⁸, ruténio⁹⁵, ruténio⁹⁷, ruténio¹⁰³, ruténio¹⁰⁵, mercúrio¹⁰⁷, mercúrio²⁰³, rênio^{99m}, rênio¹⁰¹, rênio¹⁰⁵, escândio⁴⁷, telúrio^{121m}, telúrio^{122m}, telúrio^{125m}, túlio¹⁶⁵, túlio¹⁶⁷, túlio¹⁶⁸, flúor¹⁸, ítrio¹⁹⁹, iodo¹³¹. Os métodos conhecidos por aqueles versados na técnica existentes para acoplamento dos radioisótopos terapêuticos aos anticorpos, seja diretamente ou através de um agente quelante tal como EDTA, DTPA mencionados acima podem ser usados para os radioelementos os quais podem ser usados em diagnóstico. Da mesma forma, é possível mencionar rotulação com Na[I¹²⁵] através do método com cloramina T [Hunter W.M. e Greenwood F.C. (1962) Nature 194: 495] ou mesmo com tecnécio^{99m} através da técnica de Crockford *et al.*

(Patente US 4.424.200) ou ligação através de DTPA, conforme descrito por Hnatowich (Patente US 4.479.930).

Assim, os anticorpos ou seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção podem ser empregados em um processo para a detecção e/ou a quantificação de uma sobre-expressão ou de uma subexpressão, de preferência uma sobre-expressão do recetor de c-Met em uma amostra biológica, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) o contacto da amostra biológica com um anticorpo ou um de seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção;
e

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

Em uma modalidade particular, os anticorpos ou seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção podem ser empregados em um processo para a detecção e/ou a quantificação do recetor de c-Met em uma amostra biológica, para o monitoramento da eficácia de um tratamento terapêutico e/ou profilático de um cancro dependente de c-Met.

Mais geralmente, os anticorpos ou seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção podem ser vantajosamente empregados em qualquer situação onde a expressão do recetor de c-Met deve ser observada de uma maneira qualitativa e/ou quantitativa.

A amostra biológica é formada por um fluido biológico, tal como soro, sangue íntegro, células, uma amostra tecidual ou biópsias de origem humana.

Qualquer procedimento ou teste convencional pode ser empregado de forma a realizar tal detecção e/ou dosagem. O referido teste pode ser um teste de competição ou em "sanduich" ou qualquer teste conhecido por aqueles versados na técnica dependente da formação de um complexo imune do tipo anticorpo-antigénio. Seguindo as aplicações de acordo com a invenção, o anticorpo ou seus fragmentos funcionais podem ser imobilizados ou marcados. Essa imobilização pode ser realizada sobre numerosos suportes conhecidos por aqueles versados na técnica. Esses suportes podem incluir especialmente vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon ou células naturais ou modificadas. Esses suportes podem ser solúveis ou insolúveis.

À guisa de exemplo, um método preferido leva a processos imunoenzimáticos de acordo com a técnica ELISA, através de imonofluorescência ou da técnica de radio-imunoensaio (RIA) ou equivalente.

São revelados os kits ou conjuntos necessários para a realização de um método de diagnóstico de enfermidades induzidas por uma sobre-expressão ou uma subexpressão do recetor de c-Met ou para realização de um

processo para a deteção e/ou a quantificação de uma sobre-expressão ou uma subexpressão do recetor de c-Met. Em uma amostra biológica, tal como uma sobre-expressão do referido recetor caracterizado por o referido kit ou conjunto compreende os seguintes elementos:

a) um anticorpo ou seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção;

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

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

Um objeto da invenção é, da mesma forma, a utilização de um anticorpo ou uma composição de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento destinado ao direccionamento específico de um composto biologicamente ativo à células expressando ou superexpressando o recetor de c-Met.

Entende-se aqui por composto biologicamente ativo qualquer composto capaz de modular, especialmente de inibir a atividade celular, em particular, seu crescimento, sua proliferação, transcrição ou tradução génica.

É também descrito um reagente de diagnóstico *in*

vivo compreendendo um anticorpo de acordo com a invenção ou seus fragmentos funcionais, de preferência marcado, especialmente radiomarcado e sua utilização em formação de imagem médica, em particular, para detecção de cancro relacionado à expressão ou sobre-expressão, por uma célula, do recetor de c-Met.

A invenção revela também uma composição como um produto de combinação ou a um conjugado ou radioelementos de toxina/anti-c-Met de acordo com a invenção como medicamento.

A referida composição como um produto de combinação ou o referido conjugado será misturada com um excipiente e/ou um veículo farmacêuticamente aceitável.

Na presente descrição, veículo farmacêuticamente aceitável se destina a indicar um composto ou uma combinação de compostos que entram em uma composição farmacêutica sem provocar reações secundárias e o qual permite, por exemplo, facilitação da administração do(s) composto(s) ativo(s), um aumento em sua expectativa de vida e/ou em sua eficácia no corpo, um aumento em sua solubilidade em solução ou mesmo um aprimoramento em sua conservação.

Esses veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem-conhecidos e serão adaptados por aqueles versados na técnica como uma função da natureza e/ou do modo de administração do(s) composto(s) ativo(s) escolhido(s).

Estes compostos serão administrados através da via sistêmica, em particular através da via intravenosa, através da via intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou subcutânea ou através da via oral. De uma maneira mais preferida, a composição compreendendo os anticorpos de acordo com a invenção será administrada várias vezes, de uma maneira sequencial.

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

Outras características e vantagens da invenção aparecerão na continuação da descrição com os exemplos e as figuras, em que:

Figura 1: exemplos de perfis por FACS dos anticorpos anti-c-Met selecionados;

Figuras 2 A e 2B: inibição *in vitro* de proliferação de BXP3 por anticorpos que objetivam c-Met;

Figura 3: inibição de dimerização de c-Met;

Figura 4: reconhecimento de proteína por anticorpos anti-c-Met;

Figuras 5A e 5B: "Mapeamento de epítopo" de 11E1 e 5D5 através de análise BIAcore;

Figuras 6A e 6B: efeito de MAb sobre a fosforilação de c-Met;

Figuras 7A e 7B: deslocamento de HGF rádio-rotulada por anticorpos anti-c-Met;

Figura 8: inibição de invasão por anticorpos anti-c-Met [nessa Figura, SVF significa Soro Fetal de Bezerro (FCS)];

Figura 9: efeito de anticorpos anti-c-Met sobre a cicatrização de ferimentos;

Figuras 10A e 10B: ensaio de dispersão;

Figura 11: ensaio de tubulogênese tridimensional;

Figuras 12A e 12B: efeito de anticorpos sobre a formação de esferoide;

Figura 13: atividade *in vivo* de Mabs anti-c-Met no modelo de xenoenxerto U87MG;

Figura 14: expressão de HGF por um conjunto de linhagens de células tumorais;

Figuras 15A e 15B: caracterização da linhagem de célula NCI-H441; com a Figura 15A correspondendo à análise de RT-PCR quantitativa e a Figura 15B correspondendo à análise por FACS ;

Figura 16: atividade *in vivo* de anticorpos anti-c-Met sobre o modelo de xenoenxerto NCI-H441;

Figura 17A: alinhamento de VL de 224G11 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKV3-5*01;

Figura 17B: alinhamento de VL de 224G11 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKJ4*01;

Figura 18A: alinhamento de VL de 224G11 aos genes de linhagem germinativa humana IGKV3-11*01 e IGKV4-1*01;

Figura 18B: alinhamento de VL de 224G11 ao gene de linhagem germinativa humana IGKJ4*02;

Figura 19A: versão humanizada baseada em IGKV3-11*01 de VL de 224G11 com mutações mencionadas;

Figura 19B: versão humanizada baseada em IGKV4-1*01 de VL de 224G11 com mutações mencionadas;

Figura 20A: alinhamento de VH de 224G11 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHV1-18*01;

Figura 20B: alinhamento de VH de 224G11 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHD2-4*01;

Figura 20C: alinhamento de VH de 224G11 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHJ2*01;

Figura 21A: alinhamento de VH de 224G11 ao gene de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02;

Figura 21B: alinhamento de VH de 224G11 ao gene de linhagem germinativa humana IGHJ4*01;

Figura 22: VH de 224G11 humanizada com mutações mencionadas;

Figura 23A: alinhamento de VL de 227H1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKV3-5*01;

Figura 23B: alinhamento de VL de 227H1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKJ4*01;

Figura 24A: alinhamento de VL de 227H1 ao gene de linhagem germinativa humana IGKV3-11*01 e IGKV4-1*01;

Figura 24B: alinhamento de VL de 227H1 ao gene de linhagem germinativa humana IGKJ4*02;

Figura 25A: versão humanizada baseada IGKV3-11*01 da VL de 227H1 com mutações mencionadas;

Figura 25B: versão humanizada baseada IGKV4-1*01 da VL de 227H1 com mutações mencionadas;

Figura 26A: alinhamento de VH de 227H1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHV1-18*01;

Figura 26B: alinhamento de VH de 227H1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHD1-1*02;

Figura 26C: alinhamento de VH de 227H1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHJ2*01;

Figura 27A: alinhamento de VH de 227H1 ao gene de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02;

Figura 27B: alinhamento de VH de 227H1 ao gene de linhagem germinativa humana IGHJ4*01;

Figura 28: VH de 227H1 humanizada com mutações mencionadas;

Figura 29A: alinhamento de VL de 223C4 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKV12-46*01;

Figura 29B: alinhamento de VL de 223C4 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKJ2*01;

Figura 30A: alinhamento de VL de 223C4 ao gene de linhagem germinativa humana IGKV1-NL1 *01;

Figura 30B: Alinhamento de VL de 223C4 ao gene de linhagem germinativa humana IGKJ2*01;

Figura 31: VL de 223C4 humanizada com mutações mencionadas;

Figura 32A: alinhamento de 223C4 VH ao gene de linhagem germinativa de murino IGHV1-18*01;

Figura 32B: alinhamento de 223C4 VH ao gene de linhagem germinativa de murino IGHD6-3*01;

Figura 32C: alinhamento de 223C4 VH ao gene de linhagem germinativa de murino IGHJ4*01;

Figura 33A: alinhamento de 223C4 VH ao gene de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02;

Figura 33B: alinhamento de 223C4 VH ao gene de linhagem germinativa humana IGHD1-26*01;

Figura 33C: alinhamento de 223C4 VH ao gene de linhagem germinativa humana IGHJ6*01; e

Figura 34: VH de 223C4 humanizada com mutações mencionadas;

Figura 35: atividade antitumor do Mab 224G11 de murino isoladamente ou combinado com Navelbine® sobre o modelo de tumor de xenoenxerto NCI-H441 estabelecido;

Figura 36: avaliação de Mabs anti-c-Met sobre a proliferação de HUVEC;

Figura 37: avaliação de Mabs anti-c-Met sobre a formação de tubo em HUVEC;

Figura 38A: alinhamento de VL de 11E1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKV4-79*01;

Figura 38B: alinhamento de VL de 11E1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGKJ4*01;

Figura 39A: alinhamento de VL de 11E1 ao gene de linhagem germinativa humana IGKV3D-7*01;

Figura 39B: alinhamento de VL de 11E1 ao gene de linhagem germinativa humana IGKJ4*02;

Figura 40: versão Humanizada de VL de 11E1 com mutações mencionadas;

Figura 41A: alinhamento de VH de 11E1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHV1-7*01;

Figura 41B: alinhamento de VH de 11E1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHD4-1*01;

Figura 41C: alinhamento de VH de 11E1 ao gene de linhagem germinativa de murino IGHJ3*01;

Figura 42A: alinhamento de VH de 11E1 aos genes de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02 e IGHV1-46*01;

Figura 42B: alinhamento de VH de 11E1 ao gene de linhagem germinativa humana IGHJ4*03;

Figura 43: VH de 11E1 humanizada com mutações mencionadas;

Figuras 44A e 44B: ensaio de fosforilação de c-Met sobre células A549. Avaliação de Mabs purificados 11E1 e 224G11, na ausência ou presença de HGF, a 30 µg/ml (Figura 44A) ou dentro de uma faixa de dose de 0,0015 a 30 µg/ml de forma a determinar os valores de EC50 (Figura 44B);

Figura 45: combinação *in vivo* de Mab 224G11 com Navelbine® no modelo de xenoenxerto NCI-H441 em NSCLC;

Figura 46: combinação *in vivo* de Mab 224G11 com Doxorubicina no modelo de xenoenxerto NCI-H441 em NSCLC;

Figura 47: combinação *in vivo* de Mab 224G11 com Docetaxel no modelo de xenoenxerto NCI-H441 em NSCLC;

Figura 48: combinação *in vivo* de Mab 224G11 com Temozolomida no modelo de xenoenxerto NCI-H441 em NSCLC;

Figuras 49A, 49B, 49C e 49D: efeito de Mabs anti-c-Met sobre o efeito de crescimento de esferoide U87-MG;

Figuras 50A e 50B: atividade *in vitro* de formas quiméricas e humanizadas de 224G11 no ensaio de fosfo-cMet;

Figura 51: configurações de análise Biacores;

Figura 52: atividade *in vivo* de 224G11 sobre células MDA-MB-231 coimplantadas com células MRC5 como uma fonte de HGF humana sobre ratinhos nus atímicos;

Figura 53: ensaio de ligação baseado em ELISA ao Fc-cMet. A atividade de ligação anti-Fc-c-Met foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc de murino foram usados para detectar os anticorpos monoclonais de murino purificados 11E1, 224G11 e 227H1. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico foram medidas a 450 nm;

Figura 54: ensaio de competição de HGF-cMet. Nesse ensaio baseado em ELISA, a ligação residual de Fc-c-Met recombinante ao HGF revestido sobre plástico na presença de anticorpos monoclonais de murino purificados 11E1, 224G11 e 227H1 foi detectada com um conjugado anti-Fc de murino e medida a 450 nm;

Figura 55: alinhamento de sequências de aminoácidos dos domínios VH recombinantes 227H1-derivados. A sequência de aminoácidos de VH de 227H1 é alinhada com a sequência de estrutura principal recetora humana selecionada, com apenas

os aminoácidos mencionados que se verificou serem diferentes da sequência VH de 227H1 de murino. As sequências de VH de 227H1 HZ1, HZ2 e HZ3 correspondem às versões humanizadas implementadas do domínio VH de 227H1 de murino, com os resíduos de murino restantes em negrito. Em HZ3, 10 resíduos (*) foram automaticamente trocados por suas contrapartes humanas. Em HZ2, os sete resíduos do terceiro grupo (3) foram estudados. Em HZ1VH, os nove resíduos do segundo grupo (2) sofreram mutação para suas contrapartes humanas, apenas os seis resíduos do primeiro grupo (1) permanecem de murino;

Figura 56: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 227H1 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados de Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 227H1-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de anticorpos 227H1 derivados de domínios VH humanizados foram medidas a 450 nm e, então, comparadas com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 57: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 227H1 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados de Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 227H1-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose

sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico do anticorpo 227H1 humanizado HZ4VH-derivado foram medidas a 450 nm e, então, comparadas àsquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 58: ensaio de competição de HGF-cMet de anticorpos recombinantes e 227H1 de murino. Nesse ensaio baseado em ELISA, a ligação residual de Fc-cMet recombinante a HGF revestido sobre plástico na presença das diferentes formas do anticorpo 227H1 foi detectada com um anticorpo anti-c-Met biotinilado não relacionado. O anticorpo monoclonal 227H1 purificado de murino, anticorpos quiméricos e 227-H1-derivados humanizados HZ4VH-derivados foram testados e comparados com relação à suas capacidades de competir com a ligação HGF-cMet quando medido a 450 nm;

Figura 59: sequência do domínio variável humanizado de VH de 227H1-HZ. * corresponde aos aminoácidos alterados para suas contrapartes humanas; ! corresponde aos aminoácidos humanizados durante a implementação HZ3 para HZ1; § corresponde aos aminoácidos humanizados no final da sequência VH de 227H1-HZ;

Figura 60: alinhamento de sequências de aminoácidos de domínios VH recombinantes 11E1-derivados. A VH da sequência de aminoácidos de 11E1 é alinhada com a sequência de estrutura principal recetora humana selecionada, com mencionados apenas os aminoácidos que se descobriu serem diferentes da sequência VH de 11E1 de murino. As sequências

HZ VH1, VH2 e VH3 de 11E1 correspondem às versões humanizadas implementadas do domínio VH de 11E1 de murino, com os resíduos de murino restantes em negrito. Em HZ VH3, sete resíduos (*) foram automaticamente trocados por suas contrapartes humanas. Em HZ VH2, os sete resíduos do terceiro grupo (3) foram estudados. Em HZ VH1, os cinco resíduos do segundo grupo (2) sofreram mutação para suas contrapartes humanas, apenas os cinco resíduos do primeiro grupo (1) permanecem de murino;

Figura 61: ensaio de ligação baseado em ELISA de Fc-cMet a anticorpos recombinantes 11E1. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 11E1-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met revestido sobre plástico de anticorpos 11E1 derivados de domínios VH humanizados foram medidas a 450 nm e, então, comparadas com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 62: alinhamento de sequência de aminoácidos de domínios VL recombinantes 11E1-derivados. A VL da sequência de aminoácidos de 11E1 é alinhada à sequência de estrutura principal recetora humana selecionada, mencionados apenas o aminoácidos que se verificou serem diferentes da VL de murino da sequência de 11E1. As sequências HZ VL1, VL2 e VL3 de 11E1 correspondem às versões humanizadas implementadas do domínio VL de murino de 11E1, com os resíduos

de murino restantes em negrito. Em HZ VL3, dez resíduos (*) foram automaticamente trocados por suas contrapartes humanas. Em HZ VL2, os oito resíduos do terceiro grupo (3) foram estudados. Em HZ VL1, os oito resíduos do segundo grupo (2) sofreram mutação para suas contrapartes humanas, apenas os quatro resíduos do primeiro grupo (1) permanecem de murino;

Figura 63: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 11E1 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 11E1-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de anticorpos 11E1 derivados de domínios VL humanizados foram medida a 450 nm e, então, comparadas àquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 64: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 11E1 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 11E1-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose a Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de anticorpos 11E1 derivados de domínios humanizados únicos ou duplos foram medidas a 450 nm e, então, comparadas com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 65: alinhamento de sequências de aminoácidos de VH da sequência de domínio de 224G11. A sequência de aminoácidos de VH de 224G11 é alinhada com a sequência VH de 227H1 (são sublinhados resíduos não-homólogos) e à sequência de estrutura principal recetora humana selecionada, mencionados apenas os aminoácidos que se verificou serem diferentes da sequência VH de 224G11 de murino. A sequência VH0 de 224G11 HZ corresponde à versão humanizada "227H1-baseada/total-IMGT" do domínio VH de 224G11 de murino. Nessa sequência, nenhum resíduo fora das CDRs-IMGT permanece de murino;

Figura 66: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 224G11 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes derivados de 224G11 humanizados e derivados de HZVH0 quiméricos. As atividades de ligação dependentes de dose a Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico do anticorpo 224G11 derivado de domínio VH humanizado HZVH0 "total-IMGT" foram medidas a 450 nm e, então, comparadas àsquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 67: ensaio de competição de HGF-cMet de anticorpos recombinantes e 224G11 de murino. Nesse ensaio baseado em ELISA, a ligação residual de Fc-cMet recombinante ao HGF revestido sobre plástico na presença das diferentes formas

do anticorpo 224G11 foi detectada com um anticorpo anti-cMet biotinilado não relacionado. O anticorpo monoclonal 224G11 purificado de murino, anticorpos quiméricos e recombinantes derivados de 224G11 humanizados HZVH0-derivados foram testados e suas capacidades de competir pela ligação com HGF-cMet quando medida a 450 nm;

Figura 68: alinhamento de sequências de aminoácidos de sequências de domínio VL de 224G11. A sequência de aminoácidos de VL de 224G11 é alinhada às duas sequências de estrutura principal humanas recetoras selecionadas, mencionados apenas os aminoácidos que se verificou serem diferentes da sequência VL de 224G11 de murino. A sequência Hz VL3 de 224G11 corresponde à versão humanizada com "CDR1 mais curta" do domínio VH de 224G11 de murino, enquanto que HZ VL6 corresponde à versão com "CDR1 mais longa", com os resíduos de murino restantes em negrito. Para ambas as versões humanizadas básicas, os resíduos de murino restantes são classificação para um processo de humanização adicional, onde * corresponde aos aminoácidos humanizados nas versões básicas e 3, 2 e 1 correspondem aos grupos de resíduos para o planeamento das versões humanizadas implementadas;

Figura 69: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 224G11 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes 22G11-derivados quiméricos e

humanizados. As atividades de ligação dependentes de dose a Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de anticorpos 224G11 derivados de domínios VL3 e VL6 humanizados foram medidas a 450 nm e, então, comparadas com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 70: ensaio de ligação a Fc-c-Met baseado em ELISA de anticorpos 224G11 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes 224G11-derivados quiméricos e humanizados. As atividades de ligação dependentes de dose a Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de anticorpos 224G11 derivados de domínios VL humanizados foram medidas a 450 nm e, então, comparadas com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 71: ensaio de competição de HGF-cMet de anticorpos recombinantes e 224G11 de murino. Nesse ensaio baseado em ELISA, a ligação residual de Fc-cMet recombinante ao HGF revestido sobre plástico na presença das diferentes formas do anticorpo 224G11 foi detectada com um anticorpo anti-cMet biotinilado não relacionado. Anticorpo monoclonal 224G11 purificado de murino, anticorpos quiméricos e recombinante 224G11-derivado de HZ VL4 foram testados e suas capacidades de competir pela ligação com HGF-cMet quando medida a 450 nm;

Figura 72: sequência de aminoácidos da sequência de domínio

VL VL4 do 224G11 humanizado. * corresponde aos aminoácidos trocados por suas contrapartes humanas na versão HZ VL6 básica; ! corresponde aos aminoácidos humanizados durante a implementação HZ VL6 para HZ VL4; § corresponde aos aminoácidos que permaneceram de murino na sequência VL4 do 224G11-HZ;

Figura 73: ensaio baseado em ELISA de ligação a Fc-cMet de anticorpos 224G11 recombinantes. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 22G11-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de anticorpos 224G11 derivados de domínios humanizados únicos ou duplos foram medidas a 450 nm e, então, comparada com aquelas do anticorpo de origem/de referência;

Figura 74: ensaio de competição de HGF-cMet de anticorpos recombinantes e 224G11 de murino. Nesse ensaio baseado em ELISA, a ligação residual de Fc-c-Met recombinante ao HGF revestido sobre plástico na presença de diferentes formas do anticorpo 224G11 foi detectada com um anticorpo anti-c-Met biotinilado não relacionado. O anticorpo monoclonal 224G11 de murino purificado, anticorpos quiméricos e recombinantes 224G11-derivados totalmente humanizados foram testados e comparados com relação às suas capacidades de competir com a ligação ao HGF-cMet quando medido a 450 nm;

Figura 75: ensaio de ligação a Fc-cMet baseado em ELISA de anticorpos recombinantes 224G11. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 22G11-5 derivados. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de mutantes únicos dos anticorpos 224G11 VL4-derivados totalmente humanizados foram medidas a 450 nm e, então, comparadas com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência;

Figura 76: ensaio de ligação a Fc-cMet baseado em ELISA de anticorpos recombinantes 224G11. A atividade de ligação anti-Fc-cMet foi medida em um ensaio baseado em ELISA onde conjugados anti-Fc humana foram usados para detectar anticorpos recombinantes quiméricos e humanizados 22G11-derivados. As atividades de ligação dependentes de dose sobre Fc-c-Met recombinante revestido sobre plástico de mutantes únicos e múltiplos dos anticorpos 224G11 VL4-derivado totalmente humanizados foi medida a 450 nm e, então, comparada com aquelas do anticorpo quimérico de origem/de referência; e

Figura 77: ensaio de competição de HGF-cMet de anticorpos recombinantes e 224G11 de murino. Nesse ensaio baseado em ELISA, a ligação residual de Fc-c-Met recombinante ao HGF revestido sobre plástico na presença de diferentes formas do anticorpo 224G11 foi detectada com um anticorpo anti-c-

Met biotinilado não relacionado. Anticorpo monoclonal 224G11 de murino purificado, mutantes quiméricos e únicos ou múltiplos dos anticorpos recombinantes 224G11 VL4-derivatizados totalmente humanizados foram testados e comparados com relação à suas capacidades de competir com a ligação de HGF-cMet quando medida a 450 nm.

Exemplo 1: geração de anticorpos contra c-Met

Para gerar anticorpos anti-c-Met, ratinhos BALB/c de 8 semanas de idade foram imunizados 3 a 5 vezes subcutaneamente com uma linhagem de célula CHO transfectada que expressa c-Met sobre sua membrana plasmática (20×10^6 células/dose/ratinho) ou 2 a 3 vezes com uma proteína de fusão do domínio extracelular de c-Met (10-15 μg /dose/ratinho) (R&D Systems, Catálogo n° 358MT) ou fragmentos dessa proteína recombinante misturados com adjuvante completo de Freund para a primeira imunização e adjuvante incompleto de Freund para as seguintes. Protocolos mistos, nos quais ratinhos receberam células CHO-cMet e proteínas recombinantes também foram realizados. Três dias antes de fusão celular, os ratinhos receberam um reforço i.p. ou i.v. com a proteína recombinante ou fragmentos. Então, os baços dos ratinhos foram coletados e fundidos à células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) e submetidos à seleção com HAT. Quatro fusões foram realizadas. Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção, especialmente originários de murino, é possível se referir a técnicas as quais são descritas, em

particular, no manual "Antibodies" (Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, página 726, 1988) ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Kohler e Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975).

Os hibridomas obtidos foram inicialmente selecionados através de ELISA sobre a proteína recombinante c-Met e, então, através de análise por FACS sobre linhagens de célula A549 NSCLC, pancreática BxPC3 e glioblastoma U87-MG (perfis representativos foram apresentados na Figura 1) a fim de assegurar que os anticorpos produzidos eram capazes de reconhecer também o recetor nativo sobre células tumorais. Reagentes positivos nesses 2 testes foram amplificados, clonados e um conjunto de hibridomas foi recuperado, purificado e selecionado com relação à sua capacidade de inibir a proliferação celular *in vitro* no modelo BxPC3.

Para essa finalidade, 50 000 células BxPC3 foram colocadas em lâminas com 96 poços em meio RPMI, L-glutamina a 2 mM, sem SVF. 24 horas após colocação, os anticorpos a serem testados foram adicionados em uma concentração final oscilando de 0,0097 a 40 µg/ml, 60 min antes da adição de 100 ng/ml de hHGF. Após 3 dias, as células receberam um pulso de 0,5 µCi de [³H]timidina durante 16 horas. A magnitude de [³H]timidina incorporada em DNA insolúvel em ácido tricloroacético foi quantificada através de contagem de cintilação de líquido. Os resultados foram expressos

como dados brutos para avaliar prontamente o efeito agonístico intrínseco de cada Mab (Figuras 2A e 2B).

Então, anticorpos que inibem pelo menos 50% da proliferação celular foram avaliados como sobrenadantes através de análise BRET sobre células transfectadas com c-Met. Para essa finalidade, linhagens de células CHO estáveis expressando C-Met-Rluc ou C-Met-Rluc e C-Met-K1100A-YFP foram geradas. As células foram distribuídas em microlâminas brancas com 96 poços em meio de cultura DMEM-F12/FBS a 5% um ou dois dias antes das experiências BRET. As células foram primeiro cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ de forma a permitir fixação das células à placa. Às células foram, então, fornecidos 200 µl de DMEM/poço durante a noite. Imediatamente antes da experiência, o DMEM foi removido e as células rapidamente lavadas com PBS. As células foram incubadas em PBS na presença ou ausência de anticorpos a serem testados ou compostos de referência, 10 min a 37°C antes da adição de coelenterazina, com ou sem HGF, em um volume final de 50 µl. Após incubação durante mais 10 minutos a 37°C, a aquisição de emissão de luz a 485 nm e 530 nm foi iniciada usando o luminômetro Mithras (Berthold) (1 s/comprimento de onda/poço, repetido 15 vezes).

A proporção BRET foi definida conforme previamente [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 3684-3689] como: [(emissão a 530 nm)-(emissão a 485 nm) X Cf]/(emissão a 485 nm), onde Cf corresponde a (emissão a

530 nm) /(emissão a 485 nm) para células expressando a proteína de fusão Rluc apenas nas mesmas condições experimentais. Simplificação dessa equação mostra que a proporção BRET corresponde à proporção de 530/485 nm obtida quando os dois parceiros estavam presentes, corrigida pela proporção de 530/485 nm obtida sob as mesmas condições experimentais, quando apenas o parceiro fundido à luciferase de *R. reniformis* estava presente. Para fins de facilidade de leitura, os resultados são expressos em unidades de miliBRET (mBU); mBU corresponde à proporção BRET multiplicada por 1000.

Após esse segundo teste *in vitro*, 4 anticorpos i) sem atividade intrínseca como uma molécula inteira no teste funcional de proliferação, ii) que inibem significativamente a proliferação de BxPC3 (Figuras 2A e 2B) e iii) que inibem a dimerização de c-Met (Figura 3) foram selecionados. Esses 3 anticorpos do isotipo IgG1 *kappa* foram descritos como 11E1, 224G11, 223C4 e 227H1. Nas experiências, o Mab 5D5, gerado pela Genentech e disponível na ATCC, foi adicionado como um controle para a atividade agonística intrínseca.

As Figuras 2A e 2B demonstram que 11E1, 224G11, 223C4 e 227H1 não tinham qualquer atividade agonista em contraste ao 5D5, o qual induziu a uma estimulação dose-dependente de proliferação celular na ausência de ligando. Uma inibição significativa de proliferação celular foi observada com os 4 anticorpos selecionados. 5D5 não teve

efeito sobre a proliferação celular induzida por HGF nesse teste.

Quando avaliados com relação ao bloqueio de dimerização, efeitos significativos atingindo uma inibição de 32, 55, 69 e 52% de dimerização para 224G11, 223C4, 11E1 e 227H1, respectivamente, foram observados. Comparado com os sinais basais nas respectivas experiências, o anticorpo 5D5 não tem efeito nesse modelo de dimerização.

Exemplo 2: reconhecimento de proteína por anticorpos anti-c-Met

Para caracterizar o padrão de reconhecimento dos 3 anticorpos selecionados, 3 ELISAs foram configurados com a proteína c-Met recombinante, seu fragmento monomérico (obtido através de clivagem da proteína c-Met-Fc recombinante e o domínio SEMA recombinante).

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstraram que os 4 anticorpos reconheciam proteínas diméricas e monoméricas. Para realizar esses ELISAs, a proteína c-Met dimérica humana (R&D Systems, cat n° 358MT) é revestida na concentração de 0,7 µg/ml em PBS durante a noite a 4°C. Após saturação das lâminas (Costar n°3690) com uma solução de gelatina a 0,5% durante 2 horas a 37°C, sobrenadantes de hibridoma são incubados 1 hora a 37°C. Uma vez enxaguadas com PBS, o anticorpo anti-HRP de ratinho (Jackson Immuno-Research, catálogo n°115-035-164) é adicionado a cada poço

em uma diluição de 1/5000 em tampão para ELISA (gelatina a 0,1%/Tween 20 a 0,05% em PBS) e as placas incubadas durante 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens em PBS, a atividade da peroxidase é revelada através da adição de 50 µl de substrato TMB (Uptima). A reação é deixada ocorrer durante 5 min em temperatura ambiente. A reação é cessada através da adição de 50 µl/poço de uma solução a 1 M de H₂SO₄ e lida sobre um leitor para lâminas a 450 nm. O mesmo tipo de protocolo foi realizado sobre c-Met monomérica e o domínio SEMA mas, nesses casos, as proteínas foram revestidas a 5 e 3 µg/ml, respectivamente.

O Mab 5D5 introduzido como um controle positivo reconheceu, conforme esperado, a proteína SEMA. 224G11, 227H1 e 223C4 não se ligam ao domínio SEMA. 11E1 é capaz de se ligar ao SEMA.

Para determinar se 11E1 e 5D5, ambos reconhecendo o domínio SEMA, competem por epítomos em sobreposição, análise BIAcore foi realizada. O sistema BIAcore, baseado no fenômeno de Ressonância de Plasmônio em Superfície, distribui dados através de monitoramento de eventos em tempo real. Ele é, então, útil para agrupar anticorpos nas assim denominadas experiências de "mapeamento de epítopo". Um par de anticorpos incapaz de se ligar ao mesmo tempo sobre a molécula antigénica é classificado no mesmo grupo (sítios de ligação idênticos ou próximos). Em oposição, quando seus respectivos sítios de ligação estão suficientemente distintas para permitir uma ligação simultânea de

ambos os anticorpos, esses últimos são classificados em dois grupos diferentes. Em tais experiências, o antigénio é comumente usado como o ligando (imobilizado sobre a lasca sensora) e os anticorpos são usados sem qualquer rotulação como analitos (fase em solução).

Todos as experiências descritas acima foram feitos sobre um instrumento BIAcore X (GE Healthcare Europe GmbH). Uma lasca sensora CM5 (BIAcore) ativada por um Mab anti-Tag-6His de ratinho (R&D System ref. MAB050) foi preparada seguindo as instruções do fabricante usando o kit de acoplamento de amina (BIAcore). O tampão de operação (HBS-EP) e tampão de regeneração (Glicina, HCl) são da BIAcore. Uma versão solúvel recombinante do recetor de HGF humano produzido como uma molécula quimérica c-Met-Fc-Tag His era da R&D Systems (ref. 358-MT-CF). As experiências foram feitas a 25°C, em um caudal de 30 µl/min. Uma solução a 10 µg/ml de c-Met em tampão de operação foi injetada durante um minuto na célula de fluxo 2 (fc2), tipicamente, 270 RU da forma solúvel de c-Met foram capturados. A célula de fluxo 1 (fc1) foi usada como uma referência para verificar qualquer ligação não-específica dos anticorpos à matriz da lasca sensora.

Injeções sequenciais de anticorpos a serem testadas foram realizadas. Um anticorpo foi injetado sobre ambas as células de fluxo durante 2 minutos. Um segundo anticorpo (ou o mesmo) foi, então, injetado nas mesmas condições. Se nenhuma ligação significativa foi observada,

uma terceira injeção foi feita com outro anticorpo. A lasca sensora foi, então, regenerada através de uma única injeção de 30 s do tampão de regeneração. Anticorpos e c-Met-Fc foram descartados nesse estágio.

Análise dos resultados:

A capacidade de um anticorpo "A" de bloquear a ligação de um anticorpo "B" é calculada pela proporção $BIA/C = (R2A/B/R1B) \times 100$: onde $R2A/B$ é a resposta correspondendo à ligação do MAb "B" quando ele é injetado após o Mab "A" e $R1B$ é a resposta correspondendo à ligação do MAb "B" quando ele é injetado primeiro. Uma A BIA/C abaixo de 20% significa que A é capaz de bloquear a ligação de B, de modo que A e B têm sítios de ligação próximos.

O mapeamento de epítopo foi realizado com 2 Mabs, 11E1 e 5D5.

Tabela 3

2° Ab (B)	11E1	5D5
1° Ab (A)		
11E1	<u>6,5%</u>	84,2%
5D5	98,4%	<u>11,0%</u>

Visualização da ligação em torno de 270RU de c-Met-Fc capturada pela injeções sequenciais de 2 minutos dos Mabs 5D5 (primeiro), 5D5 (segundo) e 11E1 (terceiro) em uma

concentração de 10 µg/ml cada demonstrou que 5D5 e 11E1 se ligam claramente a dois sítios distantes (Figura 5A). Essa observação foi confirmada pela sequência recíproca do anticorpo (Figura 5B).

A Tabela 3 resume a proporção de cálculo obtida com as diferentes sequências desses 2 anticorpos. Valores em preto (mais de 75%) significam que o Mab A não bloqueia a ligação do Mab B. Valores em negrito/itálico (abaixo de 20%) significam que os sítios de ligação de ambos os anticorpos (A e B) são idênticos ou suficientemente próximos para impossibilitar uma ligação simultânea.

Exemplo 3: efeito de Mabs sobre a fosforilação de c-Met

Para determinar a atividade de anticorpos anti-c-Met sobre a fosforilação de c-Met, um ensaio ELISA de fosfo c-Met foi configurado. Resumidamente, 500 000 células A549 foram cultivadas em cada poço de lâminas com 6 poços em meio F12K + FCS a 10%. 16 horas antes de adição de HGF (100 ng/ml), as células foram privadas e cada anticorpo a ser testado foi adicionado em uma concentração final de 30 µg/ml 15 minutos antes de estimulação com ligando. 15 minutos após a adição de HGF, tampão de lise gelado foi adicionado, as células foram raspadas e lisatos de célula coletados e centrifugados a 13 000 rpm durante 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram quantificados com um kit BCA (Pierce) e armazenadas a -20°C. Para o ensaio ELISA, um anticorpo anti-c-Met de cabra (R&D ref. AF276) foi usado

como um anticorpo de captura (revestimento durante a noite a 4°C) e, após uma etapa de saturação (1 h em RT) com um tampão de TBS-BSA a 5%, 25 µg de proteína dos diferentes lisatos celulares foram adicionados a cada poço da placa com 96 poços. Após um tempo de incubação de 90 minutos em RT, as lâminas foram lavadas quatro vezes e um anticorpo anti-fosfo-c-Met (anti-pY1230-1234-1235 c-Met de coelho) foi adicionado. Após um tempo de incubação adicional de 1 hora e 4 lavagens, um anti-HRP de coelho (Biosource) foi adicionado durante 1 hora em RT e, então, substrato Luminol foi adicionado antes de avaliação da luminescência com um dispositivo Mithras. Os resultados apresentados na Figura 6B demonstraram que 11E1, 224G11, 223C4 e 227H1 inibem a fosforilação de c-Met em 68, 54, 80 e 65%, respectivamente, comparado com o Mab 5D5, o qual mostrou uma inibição mais fraca de fosforilação de c-Met (42%). Nesse teste, um fraco efeito basal (menos de 20%) foi observado com os 4 anticorpos candidatos (Figura 6A). Conforme descrito nos vários exemplos apresentados nessa patente, esse fraco efeito basal não tem consequências sobre a atividade dos anticorpos em outros testes *in vitro* e *in vivo*. O 5D5 usado como um controle mostrou, nesse teste, um efeito basal significativo.

Exemplo 4: deslocamento de HGF radiomarcado por anticorpos anti-c-Met

Para determinar se os anticorpos anti-c-Met eram capazes de deslocar o HGF, experiências de ligação foram

configuradas. Resumidamente, microlâminas com 96 poços FlashPlate de proteína A (Perkin Elmer) foram saturadas com gelatina a 0,5% em PBS (200 µl/poço, 2 h em temperatura ambiente) antes da adição de c-Met-Fc recombinante (R&D Systems) como uma proteína de revestimento. Dois mil µl de uma solução de c-Met-Fc a 1 µg/ml em PBS foram adicionados a cada poço. As lâminas foram, então, incubadas durante a noite a 4°C. Os sítios de proteína A residual livres foram ainda saturados com uma hIgG não relevante (0,5 µg/poço em PBS) durante 2 h em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS após cada etapa.

Para ensaios de competição, a ligação de [¹²⁵I]-HGF (atividade específica ~ 2.000 Ci/mmol) a 200 µM à c-Met imobilizada foi medida na presença de concentrações variadas dos anticorpos monoclonais anti-c-Met 11E1, 224G11, 223C4, 227H1 ou HGF (R&D Systems), oscilando de 0,1 µM a 1 µM em PBS, pH de 7,4. As lâminas foram incubadas em temperatura ambiente durante 6 h, então, contadas sobre um Contador de Cintilação Packard Top Count Microplate. A ligação não-específica foi determinada na presença de HGF a 1 µM. O anticorpo monoclonal 9G4, o qual não é direcionado à c-Met, mas reconhece especificamente uma proteína de *E. coli*, foi usado como um controle de isotipo de IgG1 de ratinho.

A percentagem de ligação [¹²⁵I]-HGF específica total foi plotado como uma função da concentração de ligando sobre gráficos semilog. As concentrações de vários inibidores requeridos para inibir a ligação de rádio

ligando em 50% (IC_{50}) foram determinadas graficamente a partir das curvas de competição sigmoidais obtidas (Figuras 7A e 7B).

Conforme esperado, HGF não-radiomarcado foi capaz de deslocar totalmente a ligação de [^{125}I]-HGF à c-Met imobilizada, enquanto que o anticorpo de controle 9G4 não mostra qualquer atividade de bloqueio de HGF (Figuras 7A e 7B). Os anticorpos monoclonais anti-c-Met 11E1, 224G11, 223C4 e 227H1 foram capazes de inibir a ligação de [^{125}I]-HGF à c-Met imobilizada, com valores de IC_{50} de 20 nM, a 3 nM, a 2,7 nM e a 5,8 nM, respectivamente. Os valores de IC_{50} determinados para os anticorpos 224G11, 223C4 e 227H1 eram comparáveis ao valor de IC_{50} determinado para o HGF não-radiomarcado, o qual estava compreendido entre 3 e 5 nM, enquanto que o anticorpo 11E1 exibiu um maior valor de IC_{50} .

Exemplo 5: inibição de invasão por anticorpos anti-c-Met

Para avaliar o efeito de inibição dos anticorpos anti-c-Met sobre o processo de invasão, células A549 foram colocadas na câmara superior de câmaras de invasão BD BioCoat™ Matrigel™ (poços com 6,5 mm de diâmetro com membranas de polycarbonato com um tamanho de 8 μ m). As células A549 foram privadas de soro 24 horas antes de realização do ensaio de invasão. Então, 500 000 células A549 foram colocadas em um tampão de quimiotaxia (meio DMEM, BSA a 0,1%, Hepes a 12 mM) na poço superior de cada câmara, sobre o revestimento de Matrigel, com ou sem o

anticorpo a ser testado (concentração final de Mab de 10 µg/ml). Após 1 hora de incubação das lâminas a 37°C com 5% de CO₂, as câmaras inferiores foram enchidas com meio de crescimento contendo 400 ng/ml de rhHGF ou com meio de crescimento apenas. As câmaras foram incubadas durante mais 48 horas a 37°C com 5% de CO₂. Ao final desse tempo de incubação, as células que permaneceram sobre a superfície superior do filtro foram gentilmente removidas com um cotonete, as células que migraram para a superfície inferior do filtro foram submetidas à lise, coradas com tampão corante CyQuant GR (Invitrogen) e contadas usando um leitor de fluorescência Berthold Mithras LB940. Todas as condições foram testadas como triplicatas.

Conforme esperado, o HGF induziu a uma invasão significativa de células tumorais comparado com aquela observada com FCS a 10% introduzido como um controle positivo (Figura 8). A IgG1 de murino 9G4 introduzida como um controle de isotipo não tem efeito significativo sobre a invasão basal ou induzida por HGF quando comparado a células colocadas na placa sem IgG. Nenhum efeito agonista foi percebido com h 11E1, 224G11, 223C4 e 227H1 quando adicionados isoladamente e inibição significativa e comparável da invasão HGF-induzida foi observada com os 3 Mabs.

Exemplo 6: inibição de cicatrização de ferimento pelos anticorpos anti-c-Met

HGF estimula a motilidade. Para determinar se os anticorpos anti-HGF eram capazes de inibir a migração,

células NCI-H441 foram desenvolvidas em alta densidade e um vão foi introduzido com a ponta de uma pipeta P200. As células foram, então, estimuladas a migrar através do vão com HGF (100 ng/ml) na presença ou na ausência de 11E1. Poços com 11E1 apenas também foram avaliados. Cada condição testada foi avaliada como seis réplicas e 3 experiências independentes foram realizadas. Após uma incubação durante a noite, as células foram visualizadas com uma Câmera Axio Vision (direcional x4).

HGF induziu a uma migração significativa, resultando em um fechamento completo do vão dentro de uma noite (Figura 9). A IgG1 irrelevante 9G4 usada como um controle de isotipo é sem qualquer efeito sobre a migração celular. Conforme esperado, um efeito agonista foi observado com o 5D5 quando adicionado isoladamente, mas uma inibição significativa de migração celular é observada com esse anticorpo na presença de HGF na porção do vão que permaneceu aberta. O fragmento Fab de 5D5 não teve qualquer efeito agonista quando adicionado isoladamente. Contudo, nenhuma atividade desse fragmento foi observada na presença de HGF. Conforme observado com o controle de isotipo 9G4, o MAb 11E1 não teve efeito agonista quando adicionado e se comportou como um antagonista total na presença de HGF.

Exemplo 7: ensaio de dispersão

Células SK-HEP-1 foram cultivadas em baixa densidade (1×10^4 células/poço) em uma placa com 24 poços

em DMEM com FCS a 10% e desenvolvidas durante 24 horas antes da adição, ao mesmo tempo, de HGF (100 ng/ml) e anticorpos a serem testados (10 µg/ml). Após 72 horas de incubação, as colônias foram fixadas e coradas com violeta cristal a 0,2% em metanol e avaliadas com relação à dispersão visualmente. Cada condição foi testada em triplicado e 3 experiências independentes foram realizadas.

A adição de HGF às células SK-HEP-1 induziu a uma dispersão celular significativa (Figuras 10A e 10B). O anticorpo 9G4 introduzido como um controle de isotipo não teve qualquer efeito isoladamente ou na presença de HGF. Conforme esperado, o anticorpo 5D5 mostrou um efeito agonista significativo isoladamente e nenhum efeito inibidor foi observado quando 5D5 foi adicionado com HGF (Figura 10A). Nenhum efeito agonístico foi observado com 11E1 (Figura 10A) nem com 224G11 (Figura 10B) adicionados isoladamente. Um efeito inibidor muito significativo desses anticorpos foi demonstrado na presença de HGF (Figuras 10A e 10B).

Exemplo 8: ensaio de tubulogênese tridimensional

Células SK-HEP-1 foram cultivadas a 1×10^4 células/poço em uma placa com 24 poços em DMEM com FCS a 10%/Matrigel (50/50) e incubadas durante 30 min antes da adição, ao mesmo tempo, de HGF (100 ng/ml) e anticorpos a serem testados (10 µg/ml). Após 7 dias de incubação, as células foram avaliadas com relação à formação de tubo

visualmente. Cada condição foi testada em triplicado e 3 experiências independentes foram realizadas.

A adição de HGF induziu a uma formação significativa de tubo em SK-HEP-1 (Figura 11). O anticorpo 9G4 introduzido como um controle de isotipo não teve qualquer efeito isoladamente ou na presença de HGF. Conforme esperado, o anticorpo 5D5 mostrou um efeito agonista significativo isoladamente e nenhum efeito inibidor foi observado quando 5D5 foi adicionado com HGF. Nenhum efeito agonístico foi observado com 11E1, 223 C4 e 224G11 adicionados isoladamente e um efeito inibidor total foi demonstrado com 11E1 e 223C4 na presença de HGF. Uma inibição parcial, mas significativa, foi observada com o Mab 224G11.

Exemplo 9: formação de esferoide

Para avaliar a capacidade de anticorpos anti-c-Met de inibir o crescimento de tumor *in vitro*, em um modelo mais próximo de uma situação *in vivo*, esferoides de células de glioblastoma humano U-87MG (ATCC n°10 HTB-14) foram gerados. As células desenvolvidas como uma monocamada foram soltas com tripsina-EDTA e resuspensas em meio de cultura de células completo (DMEM) suplementado com FBS a 10%. Os esferoides foram iniciados através de inoculação de 625 células em poços únicas de lâminas de fundo redondo com 96 poços em DMEM-FCS a 10%. Para impedir a adesão celular a um substrato, as lâminas foram pré-revestidas com polihEMA em

etanol a 95% e secas ao ar em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas sob condições padrões de cultura de célula a 37°C, 5% de CO₂ em incubadoras umidificadas. Anticorpos monoclonais purificados (10 µg/ml) foram adicionados após 3 e 7 dias de cultura de esferoide. HGF (400 ng/ml) foi adicionado uma vez após 4 dias de cultura. Os esferoides foram mantidos em cultura durante pelo menos 10 dias. Então, o crescimento de esferoide foi monitorado através de medição da área de esferoides usando um módulo de medição automática do software Axio Vision. A área foi expressa em µm². 8-16 esferoides foram avaliados para cada condição.

As Figuras 12A e 12B mostraram que, na presença de FCS a 10%, nenhuma estimulação foi observada quando HGF foi adicionado ao meio completo. Conforme esperado, o controle de isotipo 9G4 não teve efeito sobre o crescimento de esferoide. 11E1 e 223C4 reduziram significativamente o crescimento de esferoide na presença e ausência de HGF. Nenhum efeito foi observado com o fragmento Fab de 5D5.

Exemplo 10: atividade *in vivo* de Mabs anti-c-Met no modelo de xenoenxerto U87MG

Ratinhos atímicos de seis a oito semanas de idade foram alojados em gaiolas com filtro por cima esterilizadas, mantidos em condições estéreis e manipulados de acordo com as diretrizes Francesas e Europeias. U87, MG, uma linhagem de células de glioblastoma, expressando c-Met e

autócrina para o ligando HGF, foi selecionada para avaliações *in vivo*. Os ratinhos foram injetados subcutaneamente com 5×10^6 células. Então, seis dias após implante das células, os tumores eram mensuráveis (aproximadamente 100 mm^3), os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho de tumor comparável e tratados duas vezes por semana com 1 mg/dose de cada anticorpo a ser testado. Os ratinhos foram acompanhados para a observação da taxa de crescimento do xenoenxerto e alterações do peso corporal. O volume do tumor foi calculado através da fórmula: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$.

Os resultados obtidos são resumidos na Figura 13 e demonstraram que todos os anticorpos testados inibem significativamente o crescimento *in vivo* de células U87-MG. A utilização de um anticorpo de neutralização anti-IGF-IR (IgG1) no painel A demonstra que a inibição observada *in vivo* é especificamente relacionada à modulação do eixo HGF-cMet.

Exemplo 11: Atividade *in vivo* de Mabs anti-c-Met no modelo de xenoenxerto NCI-H441

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

Para determinar se essa linhagem de célula expressa altos níveis de c-Met e é capaz de produzir HGF,

RT-PCR quantitativa e FACS ou ELISA (Quantikine HGF; R&D Systems) foram realizados. Para RT-PCR quantitativa, os níveis de HGF total ou transcrito de c-Met em linhagens de célula foram avaliados através de PCR quantitativa usando a técnica-padrão TaqMan™. Os níveis de HGF ou transcrito de c-Met foram normalizados para a proteína Ribossômica do gene de controle "housekeeping", grande, P0 (RPL0) e os resultados foram expressos como valores de expressão normalizados (método 2-ddCT).

Os conjuntos de iniciador/sonda para RPL0 eram dianteiro, 5'-gaaactctgcattctcgcttcctg-3' (SEQ ID No. 47); reverso, 5'-aggactcgtttgtagcccggtga-3' (SEQ ID No. 48); e sonda 5'-(FAM)-tgcagattggctacccaactggttgca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 49). Os conjuntos de iniciador/sonda para HGF foram dianteiro, 5'-aacaatgcctctggttcc-3' (SEQ ID No. 50); reverso, 5'-cttgtagctgcgtcctttac-3' (SEQ ID No. 51); e sonda, 5'-(FAM)-ccttcaatagcatgtcaagtggagtga-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 52). Os conjuntos de iniciador/sonda para c-Met foram dianteiro, 5'-cattaaaggagacctcaccatagcta-3' (SEQ ID No. 53); reverso, 5'-cctgatcgagaaaccacaac-3' (SEQ ID No. 54); e sonda, 5'-(FAM)-catgaagcgaccctctgatgtccca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 55). O protocolo de termo-ciclização consistia em fusão a 50°C durante 2 minutos e 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 62°C durante 1 minuto.

Nenhum mRNA para HGF foi encontrado em NCI-H441 (Figura 14) e HGF não é detectável, através de ELISA, em

sobrenadantes de NCI-H441. Nessas experiências, U87-MG, uma linhagem de célula de glioblastoma conhecida como uma linhagem de célula autócrina para HGF, foi introduzida como um controle positivo. A análise por RT-PCR mostrou um nível significativo de mRNA de HGF em U87-MG e 1,9 ng de HGF/milhão de células foram detectados no sobrenadante de células U87-MG. RT-PCR quantitativa e análise por FACS, Figuras 15A e 15B, demonstraram que, conforme esperado, as células NCI-H441 superexpressam significativamente c-Met e que essa expressão era dramaticamente maior do que aquela observada para células U87-MG. Nessa experiência, a linhagem de células MCF-7 foi introduzida como um controle negativo. Tomados juntos, NCI-H441 aparece como uma linhagem de célula não-autócrina constitutivamente ativada capaz de crescer independentemente do ligando HGF, na qual uma dimerização independente de ligando de c-Met ocorreu como uma consequência da sobre-expressão do recetor.

A avaliação de anticorpos anti-c-met sobre a atividade *in vivo* dessa linhagem de célula não-autócrina pôde fornecer alguns "insights" sobre sua potência ao conferir a dimerização de c-Met.

A Figura 16 demonstra que 224G11, 11E1 e 227H1 inibiram significativamente o crescimento *in vivo* de NCI-H441, sugerindo que, além de inibição dependente de ligando, esses anticorpos capazes de inibir a dimerização também são capazes de direcionar uma inibição independente

de ligando de c-met. Conforme mencionado acima na especificação, com essa última propriedade, é mostrado que 224G11, 11E1 e 227H1 são diferentes do anticorpo anti-c-Met 5D5 com um braço (OA-5D5).

Exemplo 12: processo de humanização através de enxertagem de CDR do anticorpo 224G11

I - Humanização do domínio variável com cadeia leve

Comparação da sequência de nucleotídeo da VL de 224G11 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VL de 224G11 foi comparada a sequências de genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Genes de linhagem germinativa IGKV3-5*01 e IGKJ4*01 de murino com uma identidade de sequência de 99,31% pela região V e 94,28% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências de VL de 224G11 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 17A para o gene V e 17B para o gene J.

Comparação da sequência de nucleotídeo da VL de 224G11 com genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a VL de 224G11 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VL de 224G11 foi alinhada às sequências de genes de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT. Para otimização da seleção, alinhamentos entre as sequências protéicas foram feitos para buscar as melhores homologies.

Esses dois métodos complementares levaram à identificação de duas possíveis sequências V humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 224G11. Alinhamento nucleotídico proporciona um gene de linhagem germinativa humana IGKV3-11*01 com uma identidade de sequência de 75,99%, enquanto que alinhamento protéico proporciona o gene de linhagem germinativa humana IGKV4-1*01 com uma identidade de sequência de 67,30%. É notável que, em ambos os casos, os dois genes de linhagem germinativa mais próximos e as sequências analisadas mostrem diferentes comprimentos de aminoácido da CDR1 (10 aminoácidos na VL de 224G11; 6 aminoácidos em IGKV3-11*01; 12 aminoácidos em IGKV4-1*01). Para a região J, o melhor resultado de homologia foi primeiro obtido com o IGKJ3*01 humano, mostrando uma identidade de sequência de 80%. Mas um número maior de nucleotídeos idênticos consecutivos e

uma melhor adaptação de aminoácido foram encontrados no alinhamento com o gene de linhagem germinativa humana IGKJ4*02 (identidade de sequência de 77,14%). Assim, o gene de linhagem germinativa IGKJ4*02 foi selecionado como uma região J humana recetora para a VL de murino de CDRs de 11E1.

Os alinhamentos são representados nas Figuras 18A para a região V e 18B para a região J.

Versão humanizada da VL de 224G11

Dada a possibilidade de duas regiões V humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 224G11, duas versões humanizadas do domínio de VL de 224G11 serão descritas. A primeira corresponde a uma experiência inicial para uma estrutura principal humana com um comprimento de CDR1 mais curto (IGKV3-11*01), a segunda com um comprimento de CDR1 mais longo (IGKV4-1*01).

a) Versão humanizada baseada em IGKV3-11*01 da VL de 224G11

As etapas a seguir no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGKV3-11*01 e IGKJ4*02 e também das CDRs da VL de murino de 224G11 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 19A, os resíduos

em negrito na sequência VL de 224G11 correspondem aos vinte e cinco aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VL de 224G11 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGKV3-11*01 e IGKJ4*02).

Com relação ao vários critérios, tais como sua participação na interface VH/VL, na ligação a antígeno ou na estrutura da CDR, a classe de aminoácido muda entre resíduos de murino e humano, a localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, três dos vinte e cinco resíduos diferentes foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses três resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo M39 de murino para L humana, H40 para A e R84 para G. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 19A como resíduos em negrito na sequência HZ1VL de 224G11, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Como o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os resíduos classificados como dois a seguir, isto é, resíduos 15 (L/P), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) e 99 (V/F) sobre os quais mutações poderiam também ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não estão limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os dezesseis outros resíduos classificados como três dentre os vinte e cinco aminoácidos diferentes poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

A Figura 19A representa a VL de 224G11 humanizada baseada em IGKV3-11*01 implementada com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação foi feita.

b) Versão humanizada baseada em IGKV4-1*01 da VL de 224G11

As seguintes etapas no processo de humanização consistem em ligação de sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGKV4-1*01 e IGKJ4*02 e também das CDRs da VL de murino de 224G11 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 19B, os resíduos em negrito na sequência VL de 224G11 correspondem aos vinte e dois aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VL de 224G11 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGKV4-1*01 e IGKJ4*02).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação na interface VH/VL, na ligação ao antígeno ou na estrutura de CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, quatro dos vinte e dois diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses quatro resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo L4 de murino para M humana, M39 para L, H40 para A e R84 para G. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 19B como resíduos em negrito na sequência HZ2VL de 224G11, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 25 (A/S), 66 (N/T), 67 (L/R), e 93 (P/S) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra

modalidade preferida, todos os catorze outros resíduos classificados como três dentre os vinte e dois diferentes aminoácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

A Figura 19B representa a VL de HGF humanizada baseada em IGKV4-1*01 implementada com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

II - Humanização do domínio variável de cadeia pesada

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 224G11 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VH de 224G11 foi comparada às sequências dos genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Genes de linhagem germinativa IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 e IGHJ2*01 de murino com uma identidade de sequência de 92,70% para a região V, 75,00% para a região D e 89,36% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente

as sequências de VH de 224G11 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figura 20A para o gene V, 20B para o gene D e 20C para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 224G11 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a VH de 224G11 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VH de 224G11 foi alinhada às sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT. Para otimização da seleção, alinhamentos entre as sequências proteicas foram feitos para buscar melhores homologias.

Esses dois métodos complementares levam à identificação da mesma sequência V IGHV1-2*02 recetora humana para a VH de murino de CDRs de 224G11 com uma identidade de sequência de 75,00% a nível nucleotídico e 64,30% a nível proteico.

É notável que a região D pertence estritamente à região CDR3 no domínio VH. O processo de humanização é baseado em uma abordagem de "enxertagem de CDR". Análise dos D-genes humanos mais próximos não é útil nessa estratégia.

Buscas por homologias para a região J levam à identificação do gene de linhagem germinativa humana IGHJ4*04 com uma identidade de sequência de 78,72%.

O gene de linhagem germinativa V humana IGHV1-2*02 e o gene de linhagem germinativa J humana IGHJ4*01 foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VH de murino de CDRs de 224G11.

Os alinhamentos são representados na Figura 21A para a região V e 21B para a região J.

Versão humanizada de VH de 224G11

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGHV1-2*02 e IGHJ4*01 e também das CDRs da VH de murino de 224G11 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 22, os resíduos em negrito na sequência VH de 224G11 correspondem aos trinta aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio V de 224G11 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGHV1-2*02 e IGHJ4*01).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação conhecida na interface VH/VL, na ligação a

antigénio ou na estrutura da CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, quatro dos trinta diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses quatro resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo D51 de murino para E humana, G55 para W, V80 para R e K82 para T. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 22 como resíduos em negrito na sequência HZVH de 224G11, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 25 (T/A), 48 (E/Q), 49 (S/G), 53 (I/M), 76 (AV), 78 (L/M) e 90 (D/E) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os dezenove outros resíduos classificados como três entre os trinta diferentes aminoácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

A Figura 22 representa a VH humanizada de 224G11 com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Exemplo 13: processo de humanização através de enxertagem de CDR do anticorpo 227H1

I - Humanização do domínio variável de cadeia leve

Comparação da sequência nucleotídica da VL de 227H1 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VL de 227H1 foi comparada às sequências dos genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://im.gt.cines.fr>).

Genes de linhagem germinativa de murino IGKV3-5*01 e IGKJ4*01 com uma identidade de sequência de 96,90% para a região V e 97,29% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências de VL de 227H1 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 23A para o gene V e 23B para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VL de 227H1 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a VL de 227H1 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VL de 227H1 foi alinhada com as sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT.

Para otimização da seleção, alinhamentos entre as sequências proteicas foram feitos para buscar melhores homologies.

Esses dois métodos complementares levam à identificação duas possíveis sequências V humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 227H1. Alinhamento nucleotídico proporciona o gene de linhagem germinativa humana IGKV3-11*01 com uma identidade de sequência de 74,91%, enquanto que alinhamento proteico proporciona o gene de linhagem germinativa humana IGKV4-1*01, com uma identidade de sequência de 64,00%. É notável que, em ambos os casos, os dois genes de linhagem germinativa mais próximos e as sequências analisadas mostrem diferentes comprimentos de aminoácido da CDR1 (10 aminoácidos na VL de 227H1; 6 aminoácidos em IGKV3-11*01; 12 aminoácidos em IGKV4-1*01).

Para a região J, o melhor resultado de homologia

foi primeiro obtido com o IGKJ3*01 humano mostrando uma identidade de sequência de 78,38%. Mas um maior número de nucleotídeos consecutivos idênticos e uma melhor adaptação de aminoácido foram encontrados no alinhamento com o gene de linhagem germinativa humana IGKJ4*02 (identidade de sequência de 75,68%). Assim, o gene de linhagem germinativa IGKJ4*02 foi selecionado como região J humana recetora para a VL de murino de CDRs de 227H1.

Os alinhamentos são representados na Figuras 24A para a região V e 24B para a região J.

Versão humanizada de VL de 224G11

Dada a possibilidade de duas regiões V humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 227H1, duas versões humanizadas do domínio VL de 227H1 serão descritas. A primeira corresponde a uma experiência inicial para uma estrutura principal humana com um comprimento de CDR1 mais curto (IGKV3-11*01), a segunda com um comprimento de CDR1 mais longo (IGKV4-1*01).

a) Versão humanizada de VL de 227H1 baseada em IGKV3-11 *01

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGKV3-11*01 e IGKJ4*02 e também das CDRs da VL de murino de 227H1 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 25A, os resíduos em negrito na sequência VL de 227H1 correspondem aos vinte e seis aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VL de 227H1 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGKV3-11*01 e IGKJ4*02).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação conhecida na interface VH/VL, na ligação a antígeno ou na estrutura da CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, três dos vinte e seis diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses três resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo I39 de murino para L humana, H40 para A e R84 para G. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 25A como resíduos em negrito na sequência HZ1VL de 227H1, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 15 (L/P), 25 (V/A), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) e 99 (S/F) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os dezesseis outros resíduos classificados como três dentre os vinte e cinco diferentes aminoácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

Figura 25A representa a VL humanizada de 227H1 baseada em IGKV3-11*01 implementada com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

b) Versão humanizada de VL de 227H1 baseada em IGKV4-1 *01

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGKV4-1*01 e IGKJ4*02 e também das CDRs da VL de murino de 227H1 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 25B, os resíduos em negrito na sequência VL de 227H1 correspondem aos vinte e quatro aminoácidos que se verificou serem diferentes

entre o domínio VL de 227H1 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGKV4-1*01 e IGKJ4*02).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação conhecida in VH/VL 2 0 interface, na ligação a antígeno ou na estrutura da CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, quatro dos vinte e quatro diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses quatro resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo L4 de murino para M humana, 139 para L, H40 para A e R84 para G. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 25B como resíduos em negrito na sequência HZ2VL de 227H1, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 25 (V/S), 66 (N/T), 67 (L/R), e 93 (P/S) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a

serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os dezesseis outros resíduos classificados como três dentre os vinte e dois diferentes aminoácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

Figura 25B representa a VL humanizada de 227H1 baseada em IGKV4-1*01 implementada com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

II - Humanização do domínio variável de cadeia pesada

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 227H1 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VH de 227H1 foi comparada às sequências dos genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Genes de linhagem germinativa de murino IGHV1-18*01, IGHD1-1*02 e IGHJ2*01 com uma identidade de sequência de 92,70% para a região V, 63,63% para a região D e 91,48% para a região J, respectivamente, foram

identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências VH de 227H1 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 26A para o gene V, 26B para o gene D e 26C para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 227H1 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a VH de 224G11 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VH de 227H1 foi alinhada às sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT. A sequência V recetora humana IGHV1-2*02 para uma VH de murino de CDRs de 224G11 com uma identidade de sequência de 72,92% foi, assim, identificada.

É notável que a região D pertence estritamente à região CDR3 no domínio VH. O processo de humanização é baseado em uma abordagem de "enxertagem de CDR". Análise dos D-genes humanos mais próximos não é útil nessa estratégia.

Buscas por homologias para a região J levam à identificação do gene de linhagem germinativa humana IGHJ4*01 com uma identidade de sequência de 78,72%.

O gene de linhagem germinativa V humana IGHV1-2*02 e o gene de linhagem germinativa J humana IGHJ4*01 foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VH de murino de CDRs de 227H1.

Os alinhamentos são representados na Figuras 27A para a região V e 27B para a região J.

Para otimização da seleção, aqueles versados na técnica também poderiam fazer alinhamentos entre as sequências proteicas de forma a auxiliá-los na escolha.

Versão humanizada de VH de 227H1

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGHV1-2*02 e IGHJ4*01 e também das CDRs da VH de murino de 227H1 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 28, os resíduos em negrito na sequência VH de 227H1 correspondem aos trinta e dois aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VH de 227H1 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGHV1-2*02 e IGHJ4*01).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação conhecida na interface VH/VL, na ligação a

antigénio ou na estrutura da CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, seis dos trinta e dois diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses seis resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo L39 de murino para M humana, N40 para H, L55 para W, T66 para N, V80 para R e K82 para T. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 28 como resíduos em negrito na sequência HZVH de 227H1, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 48 (K/Q), 49 (T/G), 53 (I/M), 76 (A/V) e 78 (L/M) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os vinte e um outros resíduos classificados como três entre os trinta diferentes aminoácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

Figura 28 representa a VH humanizada de 227H1 com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Exemplo 14: processo de humanização através de enxertagem de CDR do anticorpo 223C4

I - Humanização do domínio variável de cadeia leve

Comparação da sequência nucleotídica da VL de 223C4 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VL de 223C4 foi comparada às sequências de genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Genes de linhagem germinativa de murino IGKV12-46*01 e IGKJ2*01 com uma identidade de sequência de 99,64% para a região V e 94,59% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências VL de 223C4 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 29A para o gene V e 29B para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VL de 223C4 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a VL de 223C4 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VL de 223C4 foi alinhada às sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT.

Genes de linhagem germinativa humana IGKV1-NL1*01 e IGKJ2*01 com uma identidade de sequência de 78,49% para a região V e 81,08% para a região J, respectivamente, foram identificados. Os genes de linhagem germinativa IGKV1-NL1*01 para a região V e IGKJ2*01 para a região J foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 223C4.

Os alinhamentos são representados na Figuras 30A para a região V e 30B para a região J.

Para otimização da seleção, aqueles versados na técnica também poderiam fazer alinhamentos entre as sequências proteicas de forma a auxiliá-los na escolha.

Versão humanizada de VL de 223C4

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGKV1-NL1*01 e IGKJ2*01 e também das CDRs da VL de murino de 223C4 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Nesse estágio do processo, um modelo molecular dos domínios Fv de 223C4 de murino poderia ser desenvolvido e é útil na escolha dos resíduos de murino a serem conservados em virtude de seus papéis na manutenção da estrutura tridimensional da molécula ou no sítio de ligação a antígeno e função. Mais particularmente, 9 resíduos que sofreram eventual mutação foram identificados.

Em uma primeira etapa, resíduos envolvidos nas âncoras ou estrutura de CDR serão testados. Tais resíduos são os resíduos 66 (R/N) e resíduo 68 (E/V).

Em uma segunda etapa, resíduos expostos a solvente e, como tal, que também podem estar envolvidos em imunogenicidade, também serão testados. Esses são os resíduos 49 (A/S), 51 (K/Q), 69 (S/D), 86 (D/Q) e 92 (S/N).

Então, em uma terceira etapa, resíduos envolvidos na estrutura/duplicação do domínio variável também poderiam sofrer mutação. Esses resíduos são os resíduos 46 (P/Q) e o resíduo 96 (P/S).

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos, isto é, resíduos 9 (S/A), 13 (A/V), 17 (D/E), 18 (R/T), 54 (L/V), 88 (T/S), 90 (T/K), 100 (A/G) e 101 (T/S), sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

Figura 31 representa a VL humanizada de 223C4 com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

II - Humanização do domínio variável de cadeia pesada

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 223C4 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VH de 223C4 foi comparada às sequências dos genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Os genes de linhagem germinativa de murino IGHV1-18*01, IGHD6-3*01 e IGHJ4*01 com uma identidade de sequência de 98,95% para a região V, 72,72% para a região D e 98,11% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências de VH de 223C4 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 32A para o gene V, 32B para o gene D e 32C para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 223C4 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a VH de 223C4 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VH de 223C4 foi alinhada às sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT. Os genes de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02, IGHD1-26*01 e IGHJ6*01 com uma identidade de sequência de 76,38% para a região V, 75,00% para a região D e 77,41% para a região J, respectivamente, foram identificados. Os genes de linhagem germinativa IGHV1-2*02 para a região V e IGHJ6*01 para a região J foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para as CDRs de VH de murino de 223C4.

Os alinhamentos são representados na Figuras 33A para a região V, 33B para a região D e 33C para a região J.

Para otimização da seleção, aqueles versados na técnica também poderiam fazer alinhamentos entre as sequências proteicas de forma a auxiliá-los na escolha.

Versão humanizada de VH de 223C4

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGHV1-2*02 e IGHJ6*01 e também das CDRs da VH de 223C4 de murino às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Nesse estágio do processo, um modelo molecular dos domínios Fv de 223C4 de murino poderia ser desenvolvido e é útil na escolha dos resíduos de murino a serem conservados em virtude de seus papéis na manutenção da estrutura tridimensional da molécula ou no sítio de ligação a antígeno e função. Mais particularmente, 14 resíduos como tendo sofrido eventual mutação foram identificados.

Em uma primeira etapa, resíduos envolvidos nas âncoras ou estrutura de CDR serão testados. Tais resíduos são os resíduos 40 (H/D), 45 (A/S), 55 (W/D), 66 (N/I) e 67 (Y/F).

Em uma segunda etapa, resíduos expostos a

solvente e, como tal, que também podem estar envolvidos em imunogenicidade, também serão testados. Esses são os resíduos 1 (Q/E), 3 (Q/L), 5 (V/Q), 48 (Q/M) e 80 (R/V).

Então, em uma terceira etapa, resíduos envolvidos na estrutura/duplicação do domínio variável também poderiam sofrer mutação. Esses são os resíduos 9 (A/P), 13 (K/V), 22 (S/P) e 46 (P/H).

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos, isto é, resíduos 12 (V/L), 21 (V/I), 43 (R/K), 49 (G/S), 53 (M/I), 68 (A/N), 72 (Q/K), 75 (R/K), 76 (V/A), 78 (M/L), 82 (T/K), 84 (I/S), 92 (S/R), 93 (R/S), 95 (R/T) e 97 (D/E), sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

A Figura 34 representa a VH humanizada de 223C4 com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Exemplo 15: Atividade antitumor do Mab 224G11 de murino isoladamente ou combinado com o agente quimioterapêutico Navelbine® sobre o modelo de tumor de xenoenxerto NCI-H441 estabelecido

Abordagens quimioterapêuticas de sucesso dependem, em parte, da resposta celular a indutores apoptóticos e do equilíbrio entre vias pró- e antiapoptóticas dentro da célula. O efeito proliferativo da c-Met ativada sobre a sobrevivência celular foi documentado. Ele resulta principalmente de uma expressão aumentada das proteínas antiapoptóticas Bcl-x1 e Bcl-2 como uma consequência de sinalização PI3-K-mediada a qual, por sua vez, inibe a apoptose dependente de mitocôndria (caspase 9). Na verdade, é concebível que o sistema HGF/c-Met, com seu efeito regulatório acentuado sobre o processo apoptótico, também possa influenciar a sensibilidade de células cancerígenas a químio. Essa hipótese foi testada com o Navelbine®, um agente quimioterapêutico comercializado usado para o tratamento de cancro de pulmão (Aapro et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001, 40: 251-263; Curran et al., Drugs Aging. 2002, 19: 695-697). O modelo de xenoenxerto NSCLC NCI-H441 foi usado, uma vez que foi previamente descrito que essa linhagem de célula é sensível ao Navelbine® (Kraus-Berthier et al., Clin. Cancer Res., 2000; 6: 297-304) e terapia objetivando a c-Met (Zou H. T. et al., Cancer Res. 2007, 67: 4408-4417).

Resumidamente, células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente cultivadas em meio RPMI 1640, FCS a 10% e L-Glutamina a 1%. As células foram divididas dois dias antes de enxertagem, de modo que elas estavam na fase exponencial de crescimento. Dez milhões de células NCI-H441 foram enxertadas em PBS a ratinhos nus Swiss de 7 semanas de idade. Três dias após implante, os tumores foram medidos e os animais foram divididos em 4 grupos de 6 ratinhos com tamanho de tumor comparável. Os ratinhos foram tratados i.p. com uma dose de carregamento de 2 mg de 224G11/ratinho e, então, duas vezes por semana durante 43 dias, com 1 mg de anticorpo/ratinho. O MAb 9G4 foi usado como um controle de isotipo.

Navelbine® foi fornecido através de injeções i.p. em uma dose de 8 mg/kg nos dias 5, 12, 19 pós-injeção de células. Para terapia combinada com 224G11 e Navelbine®, os dois compostos foram administrados separadamente. nessa experiência, os 2 compostos foram usados em sua dosagem ótima. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado através da fórmula: $p/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$.

A Figura 35 demonstra que 224G11 é tão eficiente quanto o Navelbine® quando usado isoladamente como uma terapia com um único agente. Um benefício significativo de combinação de ambas as terapias foi observado, com regressões completas do tumor observadas para 3 dos 6 ratinhos no dia 63.

Exemplo 16: inibidores de c-Met e angiogénese

Além de seu papel direto na regulação de uma variedade de funções de células tumorais, a ativação de c-Met também foi implicada em angiogénese tumoral. Células endoteliais expressam c-Met e o HGF estimula o crescimento, invasão e motilidade de células endoteliais (Nakamura Y. et al., Biochem. Biophys. Res., Commun. 1995, 215: 483-488; Bussolino F. et al., J. Cell Biol. 1992, 119: 629-641). A regulação coordenada de crescimento, invasão e motilidade em células endoteliais vasculares pelo HGF/c-Met foi demonstrada como resultando na formação de tubos endoteliais capilares 3D *in vitro* (Rosen E.M. et al., Supplementum to Experientia 1991, 59: 76-88).

Para determinar uma interferência potencial de MAbs anti-c-Met com angiogénese HGF-induzida, dois conjuntos de experiências foram realizados, incluindo i) a avaliação de MAbs sobre a proliferação de HUVECs e ii) o teste de MAbs sobre a formação de tubo em HUVECs.

Para experiências de proliferação, 7500 HUVECs foram colocadas em cada poço de uma placa com 96 poços previamente revestida com laminina. As células foram desenvolvidas 24 horas no meio de ensaio EMB-2 suplementado com FBS a 0,5% e heparina. Então, MAbs a serem testados (0,15 a 40 µg/ml) foram adicionados durante 1 h antes da adição de 20 ng/ml de HGF. Após mais 24 horas, as células

foram submetidas a um pulso de 0,5 μ Ci de [3 H] Timidina. A magnitude de [3 H] Timidina incorporada foi quantificada através de contagem de cintilação de líquido. Nessa experiência, o MAb 9G4 é um anticorpo irrelevante usado como um controle de isotipo de IgG1.

Os resultados, expressos como dados brutos na Figura 36, demonstram que, conforme esperado, o HGF é um indutor potente de crescimento de células HUVEC. Anticorpos avaliados na ausência de HGF não mostram qualquer atividade proliferativa agonista sobre as HUVECs, qualquer que seja a dose testada. Na presença de HGF, uma inibição dose-dependente dramática foi observada para ambos os Mabs 11E1 e 224G11.

Para avaliação da formação de tubo em HUVEC, 25000 células incubadas 30 min com anticorpos a serem testados foram colocadas em lâminas com 48 poços revestidos com Matrigel. Então, HGF a 50 ng/ml foi adicionado e as lâminas foram incubadas a 37°C. O meio foi, então, coletado e CMFDA a 5 μ M foi adicionado durante 15 min antes de observação microscópica.

Os resultados mostrados na Figura 37 demonstram que, conforme esperado, o HGF induz à formação significativa de tubo. O anticorpo 9G4 introduzido como um controle de isotipo de IgG1, não teve qualquer efeito sobre a formação de tubo HGF-induzida, enquanto que 11E1 e 224G11 inibiram dramaticamente a formação de tubo.

Exemplo 17: processo de humanização através de enxertagem de CDR do anticorpo 11E1

I - Humanização do domínio variável de cadeia leve

Comparação da sequência nucleotídica da VL de 11E1 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VL de 11E1 foi comparada às sequências dos genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Os genes de linhagem germinativa de murino IGKV4-79*01 e IGKJ4*01 com uma identidade de sequência de 98,58% para a região V e 97,22% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências de VL de 11E1 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 38A para o gene V e 38B para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VL de 11E1 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa

humana mostrando a melhor identidade com a VL de 11E1 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VL de 11E1 foi alinhada às sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT.

Os genes de linhagem germinativa humana IGKV3-7*02 e IGKV3D-7*01 com uma identidade de sequência para ambos os genes de linhagem germinativa de 69,86% para a região V foram identificados. O gene de linhagem germinativa humana IGKV3-7*02 é conhecido no banco de dados IMGT como uma "ORF", o que significa que essa sequência é encontrada no genoma humano, mas pode apresentar alguns problemas de recombinação, levando a anticorpos naturais derivados de IGKV3-7*02 não funcionais. Assim, o gene de linhagem germinativa IGKV3D-7*01 foi selecionado como a região V humana recetora para a VL de murino de CDRs de 11E1.

Para a região J, o melhor resultado de homologia foi primeiro obtido com um gene de linhagem germinativa humana IGKJ3*01 mostrando uma identidade de sequência de 78,38%. Mas um maior número de nucleotídeos consecutivos idênticos e uma melhor adaptação de aminoácido foram encontrados no alinhamento com o gene de linhagem germinativa humana IGKJ4*02 (identidade de sequência de 75,68%). Assim, o gene de linhagem germinativa IGKJ4*02 foi selecionado como região J humana recetora para a VL de murino de CDRs de 11E1.

Os alinhamentos são representados na Figuras 39A para a região V e 39B para a região J.

Para otimização da seleção, aqueles versados na técnica também poderiam fazer alinhamentos entre as sequências proteicas de forma a auxiliá-los na escolha.

Versão humanizada de VL de 11E11

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências de genes de linhagem germinativa selecionados IGKV3D-7*01 e IGKJ4*02 e também das CDRs da VL de murino de 11E1 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 40, os resíduos em negrito na sequência VL de 11E1 correspondem aos trinta aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VL de 11E1 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGKV3D-7*01 e IGKJ4*02).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação conhecida na interface VH/VL, na ligação a antígeno ou na estrutura da CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, quatro dos trinta diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses quatro resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes

humanas sendo L4 de murino para M humana, Y40 para S, Y87 para F e T96 15 para P. Esses resíduos classificados como um são mostrados na Figura 40 como resíduos em negrito na sequência HZVL de 11E1, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 24 (S/R), 53 (W/L), 66 (I/T), 67 (L/R), 86 (S/D), 95 (Q/E), 99 (A/F) ou 121 (E/D) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os dezoito outros resíduos classificados como três entre os trinta diferentes amino-ácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

Figura 40 representa a VL humanizada de E11E1 implementada com as mutações mencionadas acima claramente

identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

II - Humanização do domínio variável de cadeia pesada

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 11E1 aos genes de linhagem germinativa de murino

Como uma etapa preliminar, a sequência nucleotídica da VH de 11E1 foi comparada às sequências dos genes de linhagem germinativa de murino, parte do banco de dados IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Os genes de linhagem germinativa de murino IGHV1-7*01, IGHD4-1*01 e IGHJ3*01 com uma identidade de sequência de 94,10% para a região V, 66,67% para a região D e 100% para a região J, respectivamente, foram identificados. Com relação à identidade obtida, foi decidido usar diretamente as sequências de VH de 11E1 para buscar homologias humanas.

Esses alinhamentos são representados nas Figuras 41A para o gene V, 41B para o gene D e 41C para o gene J.

Comparação da sequência nucleotídica da VH de 11E1 aos genes de linhagem germinativa humana

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa

humana mostrando a melhor identidade com a VH de 11E1 foi buscado. Para essa finalidade, a sequência nucleotídica da VH de 11E1 foi alinhada às sequências do gene de linhagem germinativa humana, parte do banco de dados IMGT. Para otimização da seleção, alinhamentos entre as sequências proteicas foram feitos para buscar melhores homologias. Esses dois métodos complementares levam à identificação de duas possíveis sequências V recetoras humanas para uma VH de murino de CDRs de 11E1. Alinhamento nucleotídico proporciona o gene de linhagem germinativa humana IGHV1-2*02 com uma identidade de sequência de 75,69%, enquanto que o alinhamento protéico proporciona o gene de linhagem germinativa humana IGHV1-46*01 com uma identidade de sequência de 71,10%.

É notável que a região D pertence estritamente à região CDR3 no domínio VH. O processo de humanização é baseado em uma abordagem de "enxertagem de CDR". Análise dos D-genes humanos mais próximos não é útil nessa estratégia.

Buscas por homologias para a região J levam à identificação do gene de linhagem germinativa humana IGHJ4*03 com uma identidade de sequência de 80,85%.

Buscando por similaridades globais e alinhamentos de sequência, o gene de linhagem germinativa V humana IGHV1-46*01 e o gene de linhagem germinativa J humana IGHJ4*03 foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VH de murino de CDRs de 11E1.

Os alinhamentos são representados na Figuras 42A para a região V e 42B para a região J.

Versão humanizada de VH de 11H1

As etapas seguintes no processo de humanização consistem em ligação das sequências dos genes de linhagem germinativa selecionados IGHV 1-46*01 e IGHJ4*03 e também das CDRs da VH de murino de 11E1 às *frameworks* dessas sequências de genes de linhagem germinativa.

Conforme representado na Figura 43, os resíduos em negrito na sequência VH de 11E1 correspondem aos vinte e seis aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VH de 11E1 e as *frameworks* humanas selecionadas (FR humana, isto é, IGHV1-46*01 e 10 IGHJ4*03).

Com relação a vários critérios, tais como sua participação conhecida na interface VH/VL, na ligação a antígeno ou na estrutura da CDR, as alterações de classe de aminoácido entre resíduos de murino e humanos, localização do resíduo na estrutura 3D do domínio variável, cinco dos vinte e seis diferentes resíduos foram identificados como tendo sofrido eventual mutação. Esses cinco resíduos definidos mais importantes e mutações em suas contrapartes humanas sendo N40 de murino para H humana, Y55 para I, D66 para S, A80 para R e K82 para T. Esses resíduos classificados como um são mostrados na

Figura 43 como resíduos em negrito na sequência HZVH de 11E1, onde eles permaneceram de murino.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais.

Com o auxílio de um modelo molecular, outras mutações poderiam ser identificadas. Podem ser mencionados os seguintes resíduos classificados como dois, isto é, resíduos 53 (I/M), 71 (L/F), 76 (A/V), 78 (L/M) e 87 (A/V) sobre os quais mutações também poderiam ser consideradas em outra modalidade preferida.

Naturalmente, os resíduos mencionados acima a serem eventualmente testados não são limitados, mas devem ser considerados como mutações preferenciais. Em outra modalidade preferida, todos os dezesseis outros resíduos classificados como três dentre os vinte-seis diferentes aminoácidos poderiam ser reconsiderados.

Todas as mutações mencionadas acima serão testadas individualmente ou de acordo com várias combinações.

A Figura 43 representa a VH humanizada VH de 11E1 implementada com as mutações mencionadas acima claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Exemplo 18: efeito de Mabs purificados sobre a fosforilação de c-met

No exemplo 3, o efeito de Mabs anti-c-Met sobre a fosforilação foi ensaiado com sobrenadantes dosados de cada hibridoma a ser avaliado. O teste foi realizado novamente com Mabs 11E1 e 224G11 purificados que foram avaliados em uma concentração final de 30 µg/ml (a 200 nM) ou em uma faixa de dose de 0,0015 a 30 µg/ml (a 0,01-200 nM) de forma a determinar a IC₅₀ de cada anticorpo. O protocolo usado é o mesmo conforme aquele descrito no exemplo 3.

Os resultados de 3 experiências independentes são apresentados na Figura 44 e demonstram que, uma vez purificados, 11E1 e 224G11 não mostraram efeito agonista quando adicionados isoladamente à células A549 e, respectivamente, um efeito antagonista de 87 e 75% na presença de HGF. Conforme esperado, o Mab 5D5 introduzido como um controle positivo agonista, mostrou um efeito agonista significativo (58%) quando adicionado isoladamente e apenas um efeito antagonista moderado (39%) na presença de HGF. Com relação aos cálculos de EC₅₀, 11E1 e 224G11 tinham IC₅₀s nanomolares.

Exemplo 19: combinação *in vivo* de 224G11 e Navelbine® sobre o modelo de xenoenxerto NCI-H441

Células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente

cultivadas em meio RPMI 1640, FCS a 10%, L-Glutamina a 1%. As células foram divididas dois dias antes de enxertagem, estando na fase exponencial de crescimento. Dez milhões de células NCI-H441 foram enxertadas em ratinhos nus atímicos. Cinco dias após implante, os tumores eram mensuráveis e os animais foram divididos em 6 grupos de 6 ratinhos com tamanho comparável do tumor. Os ratinhos foram tratados i.p. com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab 224G11/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho até o Dia 38 ou com 3 injeções de Navelbine® (D5, D12, D19) a 8 mg/kg. Um terceiro grupo administrado com o tratamento combinado também foi incluído. Navelbine® foi fornecido através de injeções i.p. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado através da fórmula: $\pi/6 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$ e os pesos dos animais foram monitorados a cada dia durante o período de tratamento com Navelbine®. Análise estatística foi realizada em cada tempo medido usando um t-teste ou um teste de Mann-Whitney. Nessa experiência, o volume médio do tumor de grupos tratados com uma única modalidade é reduzido em 72%, 76% e 99,8% para 224G11, Navelbine® e Navelbine® + 224G11, respectivamente, no dia 41 pós-primeira injeção. No dia 41, a terapia combinada melhorou significativamente o crescimento de tumor comparado com tratamentos com uma única terapia ($p < 0,041$ comparado com Navelbine® apenas e $p < 0,002$ comparado com 224G11 apenas no dia 41), 4 de 6 ratinhos estando sem tumores no grupo com a terapia combinada. Os resultados são representados na Figura 45.

Esses resultados foram confirmados 50 dias após o final dos tratamento (D88), onde 66% dos ratinhos que receberam o tratamento combinado permaneceram livres dos tumores.

Exemplo 20: combinação *in vivo* de 224G11 e Doxorubicina sobre o modelo de xenoenxerto NCI-H441

Células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente cultivadas em meio RPMI 1640, FCS a 10%, L-Glutamina a 1%. As células foram divididas dois dias antes de enxertagem, estando na fase exponencial de crescimento. Dez milhões de células NCI-H441 foram enxertadas em ratinhos nus atímicos. Cinco dias após implante, os tumores eram mensuráveis e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho comparável do tumor. Os ratinhos foram tratados i.p. com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab 224G11/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho ou com 4 injeções de Doxorubicina (D5, D12, D19, D26) a 5 mg/kg. Um terceiro grupo administrado com o tratamento combinado também foi incluído. Doxorubicina foi fornecida através de injeções i.v. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado através da fórmula: $\pi/6 \times$ comprimento \times largura \times altura e os pesos dos animais foram monitorados a cada dia durante o período de tratamento com Doxorubicina. Análise estatística foi realizada em cada tempo medido usando um t-teste ou um teste de Mann-Whitney. As terapias únicas e o tratamento combinado mostraram

atividade antitumor significativa comparado com o grupo de controle ($p < 0,002$ do D11 ao D39). Os resultados são representados na Figura 46.

Tratamento combinado também demonstra uma atividade anticrescimento de tumor significativa comparado com o tratamento com uma única modalidade entre D11 e D39, indicando que há um benefício em combinar Doxorubicina com um tratamento anti-c-Met.

Exemplo 21: combinação *in vivo* de 224G11 e Docetaxel sobre o modelo de xenoenxerto NCI-H441

Células NCI-H441 da ATCC foram rotineiramente cultivadas em meio RPMI 1640, FCS a 10%, L-Glutamina a 1%. As células foram divididas dois dias antes de enxertagem, estando na fase exponencial de crescimento. Dez milhões de células NCI-H441 foram enxertadas em ratinhos nus atímicos. Cinco dias após implante, os tumores eram mensuráveis e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho comparável do tumor. Os ratinhos foram tratados i.p. com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab 224G11/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho ou com 4 injeções de Docetaxel (D5, D12, D19, D26) a 7,5 mg/kg. Um terceiro grupo administrado com o tratamento combinado também foi incluído. Docetaxel foi fornecido através de injeções. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado através da fórmula: $\pi/6 \times$ comprimento \times largura \times altura e os pesos dos animais foram

monitorados a cada dia durante o período de tratamento com Docetaxel. Análise estatística foi realizada em cada tempo medido usando um t-teste ou um teste de Mann-Whitney. As terapias únicas e o tratamento combinado mostraram atividade antitumor significativa comparado com o grupo de controle ($p < 0,002$ do D11 ao D35). Os resultados são representados na Figura 47.

Tratamento combinado também demonstra uma atividade anticrescimento de tumor significativa comparado com o tratamento com uma única modalidade entre D18 e D35, indicando que há um benefício em combinar Docetaxel com um tratamento anti-c-Met.

Exemplo 22: combinação *in vivo* de 224G11 e Temozolomida sobre o modelo de xenoenxerto U87MG

Células U87-MG da ATCC foram rotineiramente cultivadas em meio DMEM, FCS a 10%, L-Glutamina a 1%. As células foram divididas dois dias antes de enxertagem, estando na fase exponencial de crescimento. Cinco milhões de células U87-MG foram enxertadas em ratinhos nus atímicos. Dezenove dias após implante, os tumores eram mensuráveis e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho comparável do tumor. Os ratinhos foram tratados i.p. com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab 224G11/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho ou com 3 injeções de Temozolomida (D19, D26, D33) a 5 mg/kg. Um terceiro grupo administrado com o

tratamento combinado também foi incluído. Temozolomida foi fornecida através de injeções. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado através da fórmula: $\pi/6$ X comprimento X largura X altura e os pesos dos animais foram monitorados a cada dia durante o período de tratamento com Temozolomida. Análise estatística foi realizada em cada tempo medido usando um t-teste ou um teste de Mann-Whitney. As terapias únicas e o tratamento combinado mostraram atividade antitumor significativa comparado com o grupo de controle ($p < 0,002$ do D22 ao D32 (onde ratinhos de controle foram sacrificados por razões éticas)). Os resultados são representados na Figura 48.

Tratamento combinado também demonstra uma atividade anticrescimento de tumor significativa comparado com o tratamento com uma única ($P < 0,002$ do dia 22 ao dia 43 (onde ratinhos de controle foram sacrificados por razões éticas) para Temozolomida e do dia 29 ao dia 53 (último dia de tratamento) para 224G11. Tomados juntos, esses dados indicam que há um benefício em combinar Temozolomida com um tratamento anti-c-Met.

Exemplo 23: formação de esferoide

Conforme já descrito no Exemplo 9 para outros Mabs, nós avaliamos a capacidade do Mab 224G11 de inibir o crescimento de tumor *in vitro* no modelo de esferoide U87-MG. Para essa finalidade, células U87-MG desenvolvidas como uma monocamada foram soltas através de tripsina-EDTA e

resuspensas em meio de cultura de células completo. Os esferoides foram iniciados através de inoculação de 625 células à poços únicas de lâminas de fundo redondo com 96 poços em DMEM-FCS a 2,5%. Para impedir a adesão celular a um substrato, as lâminas foram pré-revestidas com poliHEMA em etanol a 95% e secas ao ar em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas sob condições padrões de cultura a 37°C, 5% de CO₂ em incubadoras umidificadas. Anticorpos monoclonais purificados (10 µg/ml) foram adicionados após 4 e 10 dias de cultura de esferoide. Os esferoides foram mantidos em cultura durante 17 dias. Então, o crescimento de esferoide foi monitorado através de medição da área de esferoides usando um módulo de medição automática do software Axio Vision. A área foi expressa em µm². 8-16 esferoides foram avaliados para cada condição. O tamanho do esferoide foi medido antes de adição de anticorpos, após 10 dias de cultura e após 17 dias de cultura.

Nessas condições, esferoides homogêneos foram obtidos e nenhuma diferença estatística foi observada antes de adição de anticorpos (Figura 49A).

Conforme ilustrado nas Figuras 49B-49D, o controle de isotipo 9G4 não teve efeito sobre o crescimento de esferoides após 10 ou 17 dias de cultura. Enquanto que a adição de 5D5 não teve um grande efeito sobre o tamanho de esferoide, a adição de 224G11 e 11E1 inibiu acentuadamente o crescimento de tumor.

Exemplo 24: atividade *in vitro* de formas quiméricas e humanizadas de 224G11 no ensaio de fosfo-c-Met

De forma a comparar a eficácia *in vitro* de formas de murino, quiméricas e humanizadas em um ensaio funcional, sobrenadantes de cultura resultantes do hibridoma 224G11 e células HEK293 transfectadas foram dosados e testados conforme descrito no Exemplo 3. Os dados resumidos na Figura 50 mostraram os resultados esperados para o anticorpo de murino não purificado, conforme já descrito na Figura 6B. Os anticorpos quiméricos e humanizados não purificados mostraram uma atividade comparável, quer quando adicionados isoladamente (Figura 50A) ou quando incubados na presença de HGF (Figura 50B).

Exemplo 25: determinação de constantes de afinidade (KD) de anticorpos anti-c-Met através de análise Biacore

A afinidade de ligação de anticorpos 11E1 e 224G11 purificados foi investigada através do BIAcore X usando o Domínio Extracelular de c-Met recombinante (ECD) fundido a um domínio Fc de IgG1 (R&D Systems) como antigénio (MW = 129 kDa). Uma vez que as proteínas de fusão c-Met-Fc e anticorpos são compostos bivalentes, fragmentos Fab dos mAbs 11E1 e 224G11 (MW = 50 kDa) foram gerados através de clivagem com papaína, purificados e usados nesse ensaio para evitar interferência com o parâmetro avides. Para o ensaio, um anticorpo de captura anti-Tag de histidina foi revestido sobre lascas sensoras CM5. O tampão

de operação foi HBS-EP, o caudal foi de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ e o teste foi realizado a 25°C. Antigénio c-Met solúvel (ECD_M1)2-Fc-(HHHHHH)2 foi capturado sobre a lasca sensora (em torno de 270 RU) e os anticorpos a serem testados foram usados em solução como analitos. A lasca sensora foi regenerada usando tampão de Glicina, HCl, pH de 1,5 sobre ambas as células de fluxo durante meio minuto.

A Figura 51 ilustra o princípio dessa análise. Os parâmetros cinéticos resultantes são resumidos na tabela 4 a seguir. Eles indicam que ambos os anticorpos anti-c-Met 11E1 e 224G11 se ligam à proteína de fusão c-Met-Fc recombinante com afinidades comparáveis, oscilando de cerca de 40 μM . Tabela 4

	$K_{on1} \times 10^{-6}$ [1/M.s]	$K_{on1} \times 10^{-6}$ [1/M.s]	Meia-vida [h]	K [pM]
Fab de 11E1	1,13 \pm 0,01	4,68 \pm 0,001	4,1	41,4 \pm 0,5
Fab de 224G11	2,04 \pm 0,01	7,79 \pm 0,40	2,5	34,8 \pm 1,9

Exemplo 26: atividade in vivo de 224G11 sobre células MDA-MB-231 coimplantadas com células MRC5 como fonte de HGF humano em ratinhos nus atímicos

Células MDA-MB-213 e MRC5 da ATCC foram cultivadas em meio DMEM, FCS a 10%, L-Glutamina a 1%. As células foram divididas dois dias antes de enxertagem, estando na fase exponencial de crescimento. Cinco milhões de células MDA-MB-231 e 500 000 células MRC5 foram

coinjetadas s.c. a ratinhos nus atímicos. Doze dias após implante, os tumores eram mensuráveis e os animais foram divididos em grupos de 6 ratinhos com tamanho de tumor comparável. Os ratinhos foram tratados i.p. com uma dose de carregamento de 2 mg de Mab 224G11/ratinho e, então, duas vezes por semana com 1 mg de anticorpo/ratinho. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e calculado através da fórmula: $\pi/6$ X comprimento X largura X altura.

Os resultados descritos na Figura 52 mostraram uma diferença significativa no crescimento médio dos tumores de ratinhos tratados com 224G11 comparado com aqueles do grupo de controle.

Exemplo 27: elementos complementares sobre a humanização de anticorpos 227H1, 11E1 e 224G11

Procedimento Geral

Humanização de anticorpos anti-cMet foi realizada independentemente para cada cadeia e sequencialmente, com relação aos aminoácidos analisados em cada domínio variável. O processo de humanização foi avaliado em uma primeira tentativa em um ensaio de ligação ELISA à Fc-cMet recombinante; as atividades de ligação dos anticorpos humanizados sendo comparadas ao anticorpo quimérico recombinante. Em uma segunda tentativa, os anticorpos humanizados anti-cMet foram avaliados com relação às suas capacidades de deslocar a ligação de Fc-cMet sobre HGF recombinante

revestido sobre plástico; esse ensaio de competição permite a comparação direta de versões de murino, quiméricas e humanizadas dos anticorpos anti-cMet.

Nas Figuras 53 e 54 são exemplificadas as atividades antiligações à c-Met típicas dos anticorpos monoclonais de murino 227H1, 11E1 e 224G11.

A Figura 53 mostra as atividades antiligações diretas à c-Met de anticorpos de murino purificados detectados. Nesse ensaio, anticorpos monoclonais de murino anti-cMet mostram diferentes atividades antiligações à c-Met, mas ainda dependentes de dose.

A Figura 54 mostra as atividades de competição de ligação HGF-cMet de anticorpos purificados de murino. O ensaio de competição revela diferenças confiáveis entre esses anticorpos monoclonais anti-cMet, com uma atividade competitiva moderada, não completa, mas confiável para o anticorpo monoclonal 11E1, enquanto que os anticorpos de murino 224G11 e 227H1 mostram um padrão similar de atividades competitivas, com um máximo de 100% de deslocamento de ligação ao HGF em uma alta concentração de anticorpo. O anticorpo monoclonal 224G11 mostrou o melhor valor de IC₅₀.

É notável que as atividades de ligação direta dos anticorpos de murino não refletem suas propriedades competitivas de ligação ao HGF intrínsecas.

Esses dois ensaios foram usados para caracterizar as versões quiméricas e humanizadas recombinantes dos anticorpos antianti-cMet de murino. Para essa finalidade, resumidamente, domínios variáveis antianti-cMet, seja de murino ou humanizados, foram clonados em vetores de expressão da série pCONplus da LONZA e anticorpos recombinantes IgG1/K-derivados foram expressos em células CHO. Os sobrenadantes de cultura foram concentrados e extensivamente submetidos à diálise contra PBS e, então, dosados com relação às concentrações de anticorpos expressos e diretamente usados para analisar as atividades antiligação à c-Met correspondentes. Ensaio de ligação direta e competição-HGF foram avaliados para melhor caracterizar as versões quiméricas ou humanizadas recombinantes.

Exemplo 27-1: humanização do domínio variável de cadeia pesada de 227H1

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a sequência VH de 227H1 de murino foi buscado. Com o auxílio do banco de dados IMGT, o gene de linhagem germinativa V humana IGHV1-2*02 e o gene de linhagem germinativa J humana IGHJ4*01 foram, assim, selecionados como sequências humanas receptoras para a VH de murino de CDRs de 227H1.

A Figura 55 representa um alinhamento de aminoácido do domínio VH de 227H1 de murino com a estrutura principal selecionada. Na fileira FR humana, apenas o aminoácido que se verificou ser diferente do domínio VH do 227H1 de murino é representado. As fileiras HZ3VH, HZ2VH e HZ1VH correspondem às versões humanizadas implementadas do domínio VH de 227H1 com as mutações mencionadas acima (fileira "trocado por") claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Em uma primeira série de experiências, nós construímos e analisamos as atividades antiligação à c-Met das três versões humanizadas do domínio VH de 227H1 de murino quando expresso em combinação à cadeia leve quimérica do 227H1. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligação direta à c-Met são mostrados na Figura 56. Nessa experiência, nenhuma diferença nas capacidades de ligação dos anticorpos recombinantes quiméricos ou parcialmente humanizados 227H1-derivados testados foi observada. Nesse ponto, 26 dos 32 aminoácidos que se verificou serem diferentes entre um domínio VH de 227H1 de murino e a estrutura principal selecionada foram analisados e se descobriu não serem relevantes para a atividade antiligação à c-Met do domínio VH humanizado do 227H1, quando combinado com a cadeia leve quimérica.

Em conjunto com uma análise por mutagênese dirigida ao sítio dos últimos seis resíduos de murino na

versão humanizada HZ1VH do domínio VH de 227H1, nós construímos uma versão "total-IMGT" humanizada original HZ4VH e testamos suas propriedades antiligação à c-Met. Os resultados são fornecidos na Figura 57 para o ensaio de ligação direta e na Figura 58 para o ensaio de competição de ligação ao HGF. É notável que ambas as versões quiméricas e humanizadas recombinantes de 227H1 mostram uma melhor atividade competitiva do que o anticorpo de murino de origem.

Todavia, dado os dados experimentais obtidos com relação às propriedades antiligação à c-Met do domínio VH humanizado "total-IMGT" do 227H1, a sequência de amino-ácidos resultante representada na Figura 59 foi selecionada e uma análise bioinformática foi, então, realizada para avaliar o nível de "humanidade" do assim denominado domínio variável HZ VH humanizado do 227H1.

Para essa finalidade, uma comparação simples das sequências de estrutura principal com o banco de dados humano foi realizada usando as ferramentas IMGT. Dado o nível de humanização que nós obtivemos durante esse processo, dos 89 aminoácidos analisados correspondendo aos resíduos de estrutura principal, se descobriu que 89 eram confiáveis com uma origem humana. Apenas resíduos das CDRs podem ser diferentes mas, se assim, são diferentes do gene de linhagem germinativa humana correspondente e estão, obviamente, em posições hipervariáveis. Baseado no sistema de numeração IMGT e ferramentas de análise de homologia,

nós primeiro humanizamos totalmente um domínio variável de anticorpo originário de murino.

Exemplo 27-2:hHumanização de anticorpo monoclonal 11E1

I - Humanização do domínio variável de cadeia pesada de 11E1

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a sequência VH de 11E1 de murino foi buscado. Com o auxílio do banco de dados IMGT, o gene de linhagem germinativa V humana IGHV1-46*01 e o gene de linhagem germinativa J humana IGHJ4*03 foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VH de murino de CDRs de 11E1.

A Figura 60 representa um alinhamento de aminoácido do domínio VH de 11E1 de murino com a estrutura principal humana selecionada. Na fileira FR humana, apenas o aminoácido que se verificou ser diferente do domínio VH de 11E1 de murino é representado. As fileiras HZ VH3, HZ VH2 e HZ VH1 correspondem às versões humanizadas implementadas do domínio VH de 11E1 com as mutações mencionadas acima (fileira "trocado por") claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Em uma primeira série de experiências, construíu-

se e analisamos as atividades antiligação à c-Met das três primeiras versões humanizadas do domínio VH de 11E1 quando expresso em combinação com a cadeia leve quimérica de 11E1. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligação direta à c-Met são mostrados na Figura 61. Nessa experiência, uma capacidade de ligação similar dos anticorpos recombinantes quiméricos ou parcialmente humanizados 11E1-derivados testados foi observada. Nesse ponto, 19 dos 24 aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VH de 11E1 de murino e a estrutura principal humana selecionada foram analisados e se verificou não serem relevantes para a atividade antiligação à c-Met do domínio VH de 11E1 humanizado, quando combinado com a cadeia leve quimérica.

II - Humanização do domínio variável de cadeia leve de 11E1

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a sequência VL de 11E1 de murino foi buscado. Com o auxílio do banco de dados IMGT, o gene de linhagem germinativa V humana IGKV3D-7*01 e o gene de linhagem germinativa J humana IGKJ4*01 foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 11E1.

A Figura 62 representa um alinhamento de aminoácido do domínio VL de 11E1 de murino com a estrutura principal humana selecionada. Na fileira Fr humana, apenas o aminoácido que se verificou ser diferente do domínio VL

de 11E1 de murino é representado. As fileiras HZ VL3, HZ VL2 e HZ VL1 correspondem às versões humanizadas implementadas do domínio VL de 11E1 com as mutações mencionadas acima (fileira "trocado por") claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita.

Em uma primeira série de experiências, nós construímos e analisamos as atividades antiligação à c-Met das três primeiras versões humanizadas do domínio VL 11E1 de murino quando expresso em combinação com a cadeia pesada quimérica do 11E1. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligação direta à c-Met são mostrados na Figura 63. Nessa experiência, nós observamos capacidades de ligação similares dos anticorpos recombinantes quiméricos ou parcialmente humanizados 11E1-derivados testados. Nesse ponto, 26 dos 30 aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VL de 11E1 de murino e a estrutura principal humana selecionada foram analisados e não se verificou serem relevantes para a atividade antiligação à c-Met do domínio VL humanizado de 11E1, quando combinado com a cadeia pesada quimérica.

III - Humanização do anticorpo 11E1

Nesse estágio de humanização do anticorpo monoclonal 11E1, a sequência de anticorpo humanizado resultante teórica contém apenas cinco resíduos fora de CDRs provenientes do domínio VH de murino de origem e quatro resíduos

fora das CDRs provenientes da sequência VL de murino de origem (veja Figura 60, fileira HZ VH1 e Figura 62, fileira HZ VL1). Então, foi decidido caracterizar imediatamente a versão humanizada de cadeias leve e pesada combinada do anticorpo 11E1. Os resultados são fornecidos na Figura 64 para o ensaio antiligação direta à c-Met.

Nessa experiência, foi observado capacidades de ligação similares para os anticorpos recombinantes quiméricos ou humanizados 11E1-derivados testados. Análise de propriedades competitivas de ligação ao HGF e análise por mutagênese dirigida ao sítio da contribuição dos nove resíduos de murino à esquerda que restaram foram realizadas independentemente ou em combinação nessa versão "pré-humanizada" VH1/VL1 selecionada do anticorpo monoclonal 11E1.

Exemplo 27-3: humanização de anticorpo monoclonal 224G11

I - Humanização de domínio variável de cadeia pesada de 224G11

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a sequência VH de 224G11 de murino foi buscado.

Com relação à alta homologia de sequência entre as sequências de domínio VH de 224G11 e 227H1 e conforme confirmado através da utilização de ferramentas do banco de

dados IMGT, o mesmo gene de linhagem germinativa V humana IGHV1-2*02 e gene de linhagem germinativa J humana IGHJ4*01 foram, assim, selecionados como sequências humanas recetoras para a VH de murino de CDRs de 224G11 .

Baseado nessa alta homologia, foi decidido transferir diretamente as informações de humanização obtidas a partir de humanização do domínio VH de 227H1 (veja Exemplo 27) e, então, criou-se uma versão humanizada "total-IMGT", conforme representado na Figura 65, a qual representa um alinhamento de aminoácido dos domínios VH de 227H1 e 224G11 de murino com as *frameworks* selecionadas. Na fileira FR humana, apenas o aminoácido que se verificou ser diferente do domínio VH de 224G11 de murino é representado. A fileira HZ VH0 corresponde à versão humanizada "total-IMGT" do domínio VH de 224G11, conforme obtido para o domínio HZ VH de 227H1 "total-IMGT".

A versão humanizada "total-IMGT" do domínio VH do 224G11 de murino foi, então, construída e suas atividades antiligaçãõ à c-Met foram analisadas, quando expresso em combinação com a cadeia leve quimérica de 224G11. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligaçãõ direta à c-Met são mostrados na Figura 66, enquanto que a Figura 67 ilustra o ensaio de competiçãõ de ligaçãõ ao HGF. Dado os dados experimentais obtidos com relaçãõ às propriedades antiligaçãõ à c-Met do domínio VH de 224G11 humanizado "total-IMGT", a sequênciã de aminoácidos resultante, conforme representado na Figura 65, foi selecionada e uma análise bioinformática foi, então, realizada para avaliar o

nível de "humanidade" do assim denominado domínio HZ VH0 de 224G11.

Dada a estratégia de humanização aplicada aqui, pode-se referir ao Exemplo 27 para a análise de humanidade da sequência HZ VH0 de 224G11. Conforme descrito para a humanização do domínio VH de 227H1, nós confirmamos a confiabilidade do sistema de numeração IMGT e ferramentas de análise de homologia e também demonstramos a possibilidade de transferência da estratégia de humanização entre anticorpos sob os limites de sua homologia intrínseca.

II - Humanização do domínio variável de cadeia leve de 224G11

De forma a identificar o melhor candidato humano para o enxerto de CDR, o gene de linhagem germinativa humana mostrando a melhor identidade com a sequência VL de 224G11 de murino foi buscado. Com o auxílio de ferramentas de análise do banco de dados IMGT, duas possíveis regiões V humanas recetoras para a VL de murino de CDRs de 224G11 foram identificadas. Assim, duas estratégias de humanização foram planejadas para o domínio VL de 224G11. A primeira corresponde a uma experiência inicial para uma estrutura principal humana com um comprimento de CDR1 mais curto (IGKV3-11*01), a segunda com um comprimento de CDR1 mais longo (IGKV4-1*01).

A Figura 68 representa um alinhamento de aminoácido do domínio VL de 224G11 de murino com as duas *frameworks* selecionadas. Nas fileiras de FR Hu-FR mais curta e mais longa, apenas o aminoácido que se verificou ser diferente do domínio VL de 224G11 de murino é representado. As fileiras HZ VL3 e HZ VL6 correspondem às versões humanizadas básicas do domínio VL de 224G11 com as mutações mencionadas acima (fileira "classificação") claramente identificadas. O número sob cada mutação proposta corresponde à classificação na qual a referida mutação será feita, quer a CDR1-estrutura principal "mais curta" ou "mais longa" seja selecionada.

Em um primeiro conjunto de experiências, as duas versões humanizadas básicas do domínio VL de 224G11 de murino foram construídas e suas atividades antiligações à c-Met foram analisadas, quando expresso em combinação com a cadeia pesada quimérica de 224G11. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligações direta à c-Met são mostrados na Figura 69. Nessa experiência, uma atividade antiligações à c-Met similar foi observada para as versões quiméricas e HZ VL6 ("CDR1 mais longa"), enquanto que quase nenhuma ligação foi detectada para o anticorpo recombinante 224G11-derivado HZ VL3 ("CDR1 mais curta").

Em um segundo conjunto de experiências, nós construímos e analisamos as atividades antiligações à c-Met das versões humanizadas implementadas do domínio VH HZ VL6-derivado de 224G11 quando expresso em combinação com a cadeia pesada quimérica de 224G11. Duas formas humanizadas

adicionais foram analisadas; na versão HZ VL5, os sete resíduos do terceiro grupo (classificação 3) são humanizados e, na versão HZ VL4, os quatro resíduos à esquerda no primeiro grupo (resíduos de classificação 1) apenas permaneceram de murino. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligação direta à c-Met são mostrados na Figura 70. Nessa experiência, nenhuma diferença nas capacidades de ligação dos anticorpos recombinantes parcialmente humanizados ou quiméricos 224G11-derivados testados foi observada. Nesse ponto, 18 dos 22 aminoácidos que se verificou serem diferentes entre o domínio VL de 224G11 de murino e a estrutura principal "CDR1 mais longa" foram analisados e não se verificou serem relevantes para a atividade antiligação à c-Met do domínio VL do 224G11 humanizado, quando combinado com a cadeia pesada quimérica.

Então, foi testada a versão humanizada HZ VL4 do domínio VL de 224G11 no ensaio de competição de ligação ao HGF. Conforme mostrado na Figura 71, os resultados obtidos demonstram a atividade competitiva similar dos anticorpos derivados de 224G11 humanizados HZ VL4 e quiméricos recombinante e de murino.

Nesse estágio da humanização do domínio VL de 224G11, a sequência resultante contém apenas quatro resíduos fora das CDRs provenientes da sequência de origem de murino. Conforme mostrado na Figura 72, esses quatro resíduos S-marcados são L4, M39, H40 e R84.

Baseado no sistema de numeração IMGT e

ferramentas de análise de homologia, nós demonstramos que a estrutura principal mostrando diferenças estruturais em termos de comprimento de CDR ainda podem ser adequadas em um processo de humanização. Foi decidido caracterizar a versão humanizada de cadeias pesada e leve do anticorpo 224G11. Análise por mutagênese dirigida ao sítio da contribuição dos quatro resíduos de murino restantes foi, então, realizada quando expressa em combinação com uma versão humanizada VH0 da cadeia pesada.

III - Humanização de anticorpo 224G11

Em uma primeira série de experiências, nós construímos e analisamos as atividades antiligações à c-Met da versão totalmente humanizada do anticorpo 224G11. Essa versão recombinante abrange os domínios VH e VL VH0 e VL4 humanizados, respectivamente. Os resultados obtidos a partir do ensaio antiligação direta à c-Met são mostrados na Figura 73. Nessa experiência, descobriu-se que a atividade antiligação à c-Met do 224G11 totalmente humano era similar àquela das versões humanizada e quimérica recombinante "de uma única cadeia" do 224G11. Foi, então, testada a versão totalmente humanizada do domínio VL de 224G11 no ensaio de competição de ligação ao HGF. Os resultados obtidos conforme mostrado na Figura 74 demonstram a atividade competitiva similar dos anticorpos derivados de 224G11 totalmente humanizados e quiméricos recombinantes e de murino de origem.

Nesse estágio de humanização do anticorpo 224G11,

a sequência resultante contém apenas quatro resíduos fora das CDRs provenientes da sequência do domínio variável de cadeia leve de origem de murino. Foram, então, analisados variantes únicos por mutagênese dirigida ao sítio do domínio VL4 humanizado quando expresso em combinação com uma versão humanizada VH0 da cadeia pesada. Conforme exemplificado na Figura 75 para o ensaio de ligação direta, nós identificamos resíduos relevantes potenciais entre os quatro testados, sendo M39 e H40.

Foi decidido analisar múltiplos mutantes do domínio VL HZ VL4 humanizado de 224G11 quando expresso em combinação com o domínio VH HZ VH0 humanizado de 224G11. Conforme mostrado na Figura 76 para o ensaio de ligação direta e na Figura 77 para o ensaio de competição de ligação ao HGF, múltiplos mutantes de aminoácido do domínio VL4 foram analisados para identificar a melhor combinação humanizada. Baseado em análise de mutantes únicos, descobriu-se, sobre mutantes duplos e triplos que eles podem exibir as melhores atividades anti-cMet. O mutante VH0/VL4-2x corresponde ao domínio VH HZ VH0 de 224G11 expresso com o domínio VL HZ VL4 de 224G11 humanizado com a mutação dupla L4M/R84G. O mutante VH0/VL4-3x corresponde ao domínio VH HZ VH0 de 224G11 humanizado expresso com o domínio VL HZ VL4 de 224G11 humanizado com a mutação tripla L4M/M39L/R84G.

Dados os dados experimentais obtidos com relação às propriedades antiligação à c-Met do anticorpo totalmente humanizado 224G11, a análise bioinformática das sequências

de domínio variável pesado e leve foi, então, realizada para avaliar o nível de "humanidade" das melhores versões humanizadas VH0/VL4-2x e VH0/VL4-3x. Foi previamente demonstrado a humanização "total-IMGT" do domínio VH0 VH de 224G11. Com relação ao nível de humanidade das versões de domínio VL humanizadas VL4-2x e -3x de 224G11, elas contêm apenas resíduos de murino M39 e/ou H40. Esses dois resíduos chave potenciais estão localizados no final da CDR1, M39 sendo a âncora de CDR N-terminal. Dado o problema de comprimento da CDR que foi defrontado durante a humanização do domínio VL de 224G11 e considerando essas posições como parte da definição de Kabat da VL CDR1, o nível de humanidade do anticorpo 224G11 totalmente humanizado mostraria uma imunogenicidade fortemente reduzida em virtude dos resíduos de murino mínimos conservados.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Pierre Fabre Medicament GOETSCH, Liliane

<120> Novos anticorpos que inibem a dimerização de c-Met e suas utilizações

<130> D25728

<150> EP 07301231.2

<151> 2007-07-12

<150> US 60/929,789

<151> 2007-07-12

<150> US 61/020,639

<151> 2008-01-11

<160> 71

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 5

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 6

Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 8

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 9

Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 10

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 11

Arg Ala Ser
1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 12

Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 13

Glu Ser Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 15

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 1 5

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 16

Ala Ala Thr
 1

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 17

Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 18

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 19

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 20

Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Met Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 21

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
      20      25      30
Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35      40      45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65      70      75      80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
      85      90      95
Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
      100      105      110

```

<210> 22

<211> 111

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 22

```

Gly Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5      10      15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Val Ser Glu Ser Ile Asp Thr Tyr
      20      25      30
Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35      40      45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65      70      75      80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
      85      90      95
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
      100      105      110

```

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 23

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1      5      10      15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
      35      40      45
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65      70      75      80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr
      85      90      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105

```


<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 24
ggatacatat tcactgcata cacc 24

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 25
attaaaccaa acaatggtct tgct 24

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 26
gcaagatctg agattacgac ggaatttgac tac 33

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 27
ggttattcat tcactgacta cacc 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 28
attaatcctt acaatggtgg tact 24

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 29
gcaagagagg aaattacgaa ggactttgat ttc 33

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 30

ggatacacat tcactgacta caac 24

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 31
attaatccta acaatggtgg tact 24

<210> 32
<211> 42
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 32
gcaagagggga ggtatggttg ttactactat gctatggact ac 42

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 33
gaaagtgttg atagttatgc caatagtttt 30

<210> 34
<211> 9
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 34
cgtgcatcc 9

<210> 35
<211> 27
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 35
cagcaaagta aggaggatcc tctcacg 27

<210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 36
gaaagtattg atacttatgg caatagtttt 30

<210> 37
<211> 27
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 37
cagcaaagta atgaggatcc attcacg 27

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 38
gagaatatatt acagtaat 18

<210> 39
<211> 9
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 39
gctgcaaca 9

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 40
caacatTTTT ggggtcctcc gtacacg 27

<210> 41
<211> 354
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 41
gaggTccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcctgcaaga ctcttgata catattcact gcatacacca tgcactgggt gaggcagagc 120
cttgagaga gccttgactg gattggaggt attaaaccaa acaatgggtc tgctaactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
atggacctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagatctgag 300
attacgacgg aatttgacta ctggggccaa ggcaccgctc tcacagtctc ctca 354

<210> 42
<211> 354
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 42
gaggTccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagatt 60
tcctgcaagg ctcttggtta ttattcact gactacaccc tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga cccttgagtg gattggactt attaatcctt acaatgggtg tactacctac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcacccag cacagcctac 240
atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggaa 300
attacgaagg actttgattt ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 43
<211> 363
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 43

gaggtcctgc	tgcaacagtc	tggacctgag	ctggtgaagc	ctggggcttc	agtgaagata	60
ccctgcaagg	cttctggata	cacattcact	gactacaaca	tggactgggt	gaagcagagc	120
catggaatga	gccttgagtg	gattggagat	attaatccta	acaatgggtg	tactatcttc	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actgtagaca	agtcctccag	cacagcctac	240
atggagctcc	gcagcctgac	atctgaggac	actgcagtct	attactgtgc	aagagggagg	300
tatgttggtt	actactatgc	tatggactac	tggggtcaag	gaacctcagt	caccgtctcc	360
tca						363

<210> 44

<211> 333

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 44

gacattgtgc	tgacccaatc	tccagcttct	ttggctgtgt	ctctagggca	gagggccacc	60
atatcctgca	gagccagtga	aagtgttgat	agttatgcca	atagttttat	gcactgggtac	120
cagcagaaac	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatc	gtgcatccaa	cctagaatct	180
gggatccctg	ccaggttcag	tggcagtggg	tctaggacag	acttcaccct	caccattaat	240
cctgtggagg	ctgatgatgt	tgcaacctat	tactgtcagc	aaagtaagga	ggatccctct	300
acgttcggct	cggggacaaa	attggaaatg	aaa			333

<210> 45

<211> 333

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 45

ggcattgtgt	tgacccaatc	tccagcttct	ttggctgtgt	ctctaggaca	gagggccacc	60
atatcctgca	gagtcagtga	aagtattgat	acttatggca	atagttttat	acactgggtac	120
cagcagaaac	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatc	gtgcatccaa	cctagaatct	180
gggatccctg	ccaggttcag	tggcagtggg	tctaggacag	acttcaccct	caccattaat	240
cctgtggagg	ctgatgattc	tgcaacctat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatccattc	300
acgttcggct	cggggacaaa	gttggaaatg	aaa			333

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 46

gacatccaga	tgactcagtc	tccagcctcc	ctatctgtat	ctgtgggaga	aactgtcacc	60
atcacatgtc	gagcaagtga	gaatattttac	agtaatttag	catgggtatca	gcagaaacag	120
ggaaaatctc	ctcagctcct	ggtctatgct	gcaacaaact	tagtagatgg	tgtgccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	aggcacacag	tattccctca	agatcaacag	cctgcagtct	240
gaagattttg	ggagttatta	ctgtcaacat	ttttgggggtc	ctccgtacac	gttcggaggg	300
gggaccaagc	tggagataaa	g				321

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para o gene constitutivo da proteína Ribossomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 47

gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para o gene constitutivo da proteína Ribossomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 48

aggactcggtt tgtaccggtt ga 22

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para o gene constitutivo da proteína Ribossomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 49

tgcagattgg ctacccaact gttgca 26

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para HGF

<400> 50

aacaatgcct ctggttcc 18

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para HGF

<400> 51

cttgtagctg cgtcctttac 20

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sonda para HGF

<400> 52
ccttcaatag catgtcaagt ggagtga 27

<210> 53
<211> 28
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador para c-Met

<400> 53
cattaaagga gacctcacca tagctaata 28

<210> 54
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador para c-Met

<400> 54
cctgatcgag aaaccacaac ct 22

<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sonda para c-Met

<400> 55
catgaagcga ccctctgatg tccca 25

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 56
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 57
Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr
1 5

PE2188312

- 177 -

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 58

Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 59

Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 60
<211> 3
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 60

Thr Thr Ser
1

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 61

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 63
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 63
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80
 Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 64
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 64
 ggctacactt ttacttccta ctgg 24

<210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 65
 attaacccta ccaactgggtc tact 24

<210> 66
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 66
 gcaataggag gatatgggtc ctggtttgct tac 33

<210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 67
 tcaagtgtaa gttccaccta c 21

<210> 68
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 68
 accacatcc 9

<210> 69
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 69
 catcagtgga gtagttaccc attcacg 27

<210> 70
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 70
 cagggtccagc ttcagcagtc tgggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cactttttact tcctactgga tgaactgggt gaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaacctta ccactgggtc tactgactac 180
 aatcagaagt taaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aataggagga 300
 tatgggtcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 71
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 71
 caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctctgggga gaaggtcacc 60
 ttgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tccacctact tgtactggta ccagcagaag 120
 ccaggatcct cccccaact ctggatttat accacatcca tcctggcttc tggagtcctc 180
 gctcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
 actgaagatg ctgcctctta tttctgccat cagtggagta gttaccatt caggttcggc 300
 tcggggacaa agttggacat aaaa 324

Lisboa, 21 de agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** o anticorpo compreender uma cadeia pesada compreendendo CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 1, 2 e 3; e uma cadeia leve compreendendo CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 compreendendo, respectivamente, a sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 10, 11 e 12.

2. Anticorpo da reivindicação 1, ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** compreender uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 18 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No. 21.

3. Hibridoma de murino capaz de secretar um anticorpo como reivindicado na reivindicação 2, **caracterizado por** o referido hibridoma ser o hibridoma de murino depositado na CNCM, Institut Pasteur, Paris, em 14 de Março de 2007 sob o número 1-3731.

4. Anticorpo das reivindicações 1 ou 2, ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** o referido anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

5. Anticorpo da reivindicação 4, ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** o referido anticorpo ser um anticorpo quimérico, em que as regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada são derivadas de um anticorpo de humano.

6. Anticorpo de uma das reivindicação 1 a 5, ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** ser capaz de se ligar especificamente a c-Met.

7. Anticorpo da reivindicação 6, um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** ser capaz de inibir a ativação dependente de ligando e independente de ligando de c-Met.

8. Anticorpo da reivindicação 7, ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, **caracterizado por** ser capaz de inibir a dimerização de c-Met.

9. Ácido nucleico isolado **caracterizado por** ser escolhido dos seguintes ácidos nucleicos:

- a) um ácido nucleico, DNA ou RNA, que codifica um anticorpo ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, como reivindicado numa das reivindicações 1 e 2;
- b) um ácido nucleico compreendendo uma sequência de DNA compreendendo a sequência CDR-H1 SEQ ID No. 24, a

sequência CDR-H2 SEQ ID No. 25, a sequência CDR-H3 SEQ ID No. 26 e a sequência CDR-L1 SEQ ID No. 33, a sequência CDR-L2 SEQ ID No. 34 e a sequência CDR-L3 SEQ ID No. 35;

c) um ácido nucleico compreendendo uma sequência de DNA compreendendo a sequência de cadeia pesada SEQ ID No. 41 e a sequência de cadeia leve SEQ ID No. 44;

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

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

10. Vetor compreendendo um ácido nucleico como reivindicado na reivindicação 9.

11. Célula hospedeira compreendendo um vetor como reivindicado na reivindicação 10.

12. Método para a produção de um anticorpo ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, como reivindicado numa das reivindicações 1, 2 e 4-8, **caracterizado por** o método compreender:

a) cultura de uma célula hospedeira como reivindicada na reivindicação 11, em um meio e sob condições de cultura apropriados; e

b) a recuperação dos referidos anticorpos ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, a

partir do meio de cultura ou das referidas células cultivadas.

13. Anticorpo, ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, das reivindicações 1, 2 e 4-8, ou obtido pelo método da reivindicação 12, para utilização como medicamento.

14. Composição compreendendo, como um princípio ativo, um composto consistindo em um anticorpo ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, como reivindicado em uma das reivindicações 1, 2 e 4-8, ou obtido pelo método da reivindicação 12 ou produzido através do hibridoma produzido de acordo com a reivindicação 3.

15. Composição da reivindicação 14, **caracterizada por** compreender ainda, como um produto de combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial, um anticorpo antitumoral.

16. Composição da reivindicação 14 ou 15, **caracterizada por** compreender ainda, pelo menos um agente como um produto de combinação para utilização simultânea, separada ou sequencial, em que o referido agente é um agente citotóxico/cistostático.

17. Composição de um das reivindicações 14 a 16, **caracterizada por** pelo menos um dos referidos anticorpos ou

um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, ser conjugado com uma toxina celular e/ou um radioelemento.

18. Composição como reivindicada numa das reivindicações 14 a 17, para utilização como medicamento.

19. Utilização de um anticorpo ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, das reivindicações 1, 2 ou 4-8, ou obtido pelo método da reivindicação 12, ou produzido através do hibridoma de acordo com a reivindicação 3, ou de uma composição das reivindicações 14 a 17, para a preparação de um medicamento, para a prevenção ou tratamento de cancro.

20. Utilização da reivindicação 19, **caracterizada por** o referido cancro ser um cancro escolhido a partir de cancro de próstata, osteosarcomas, cancro de pulmão, cancro de mama, cancro endometrial, glioblastoma ou cancro de cólon.

21. Utilização da reivindicação 19 ou 20, **caracterizada por** o referido cancro ser um cancro relacionado com a ativação de c-Met, escolhido a partir de cancro que é dependente e/ou independente de HGF.

22. Método de diagnóstico *in vitro* de enfermidades induzidas por uma sobre-expressão ou subexpressão do recetor de c-Met partindo de uma amostra biológica na qual a presença anormal do recetor de c-Met é suspeita,

caracterizado por o referido método compreender uma etapa em que a referida amostra biológica é contactada com o anticorpo ou um dos seus fragmentos divalentes de ligação a c-Met, das reivindicações 1, 2 ou 4-8, ou obtido pelo método da reivindicação 12, ou produzido através do hibridoma de acordo com a reivindicação 3, sendo possível que o referido anticorpo seja, se necessário, marcado.

Lisboa, 21 de agosto de 2015

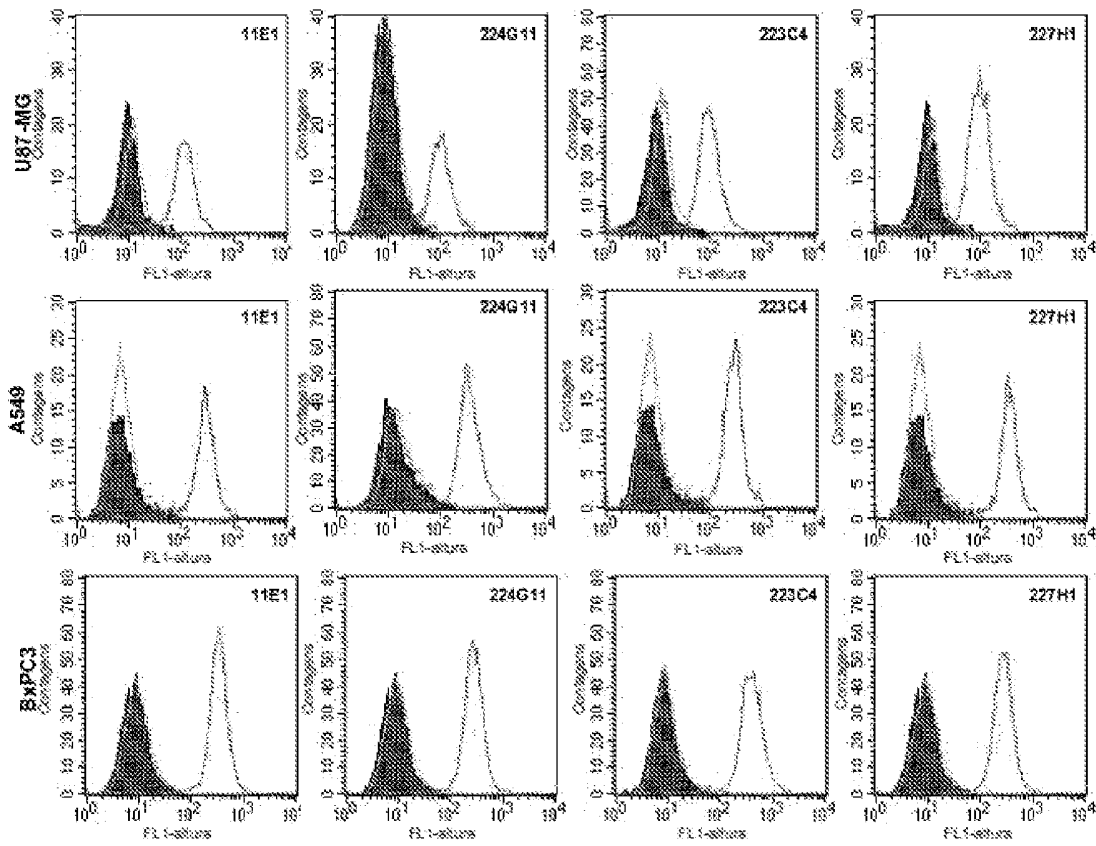


FIGURA 1

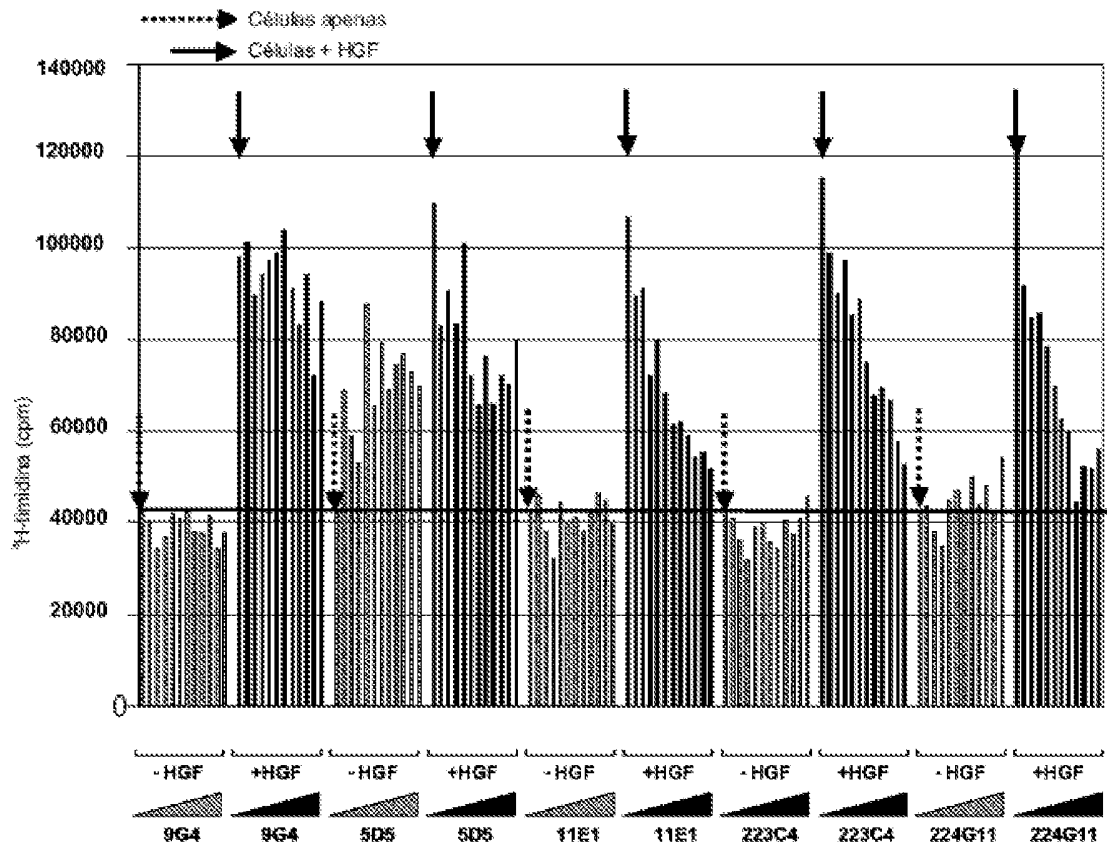


FIGURA 2A

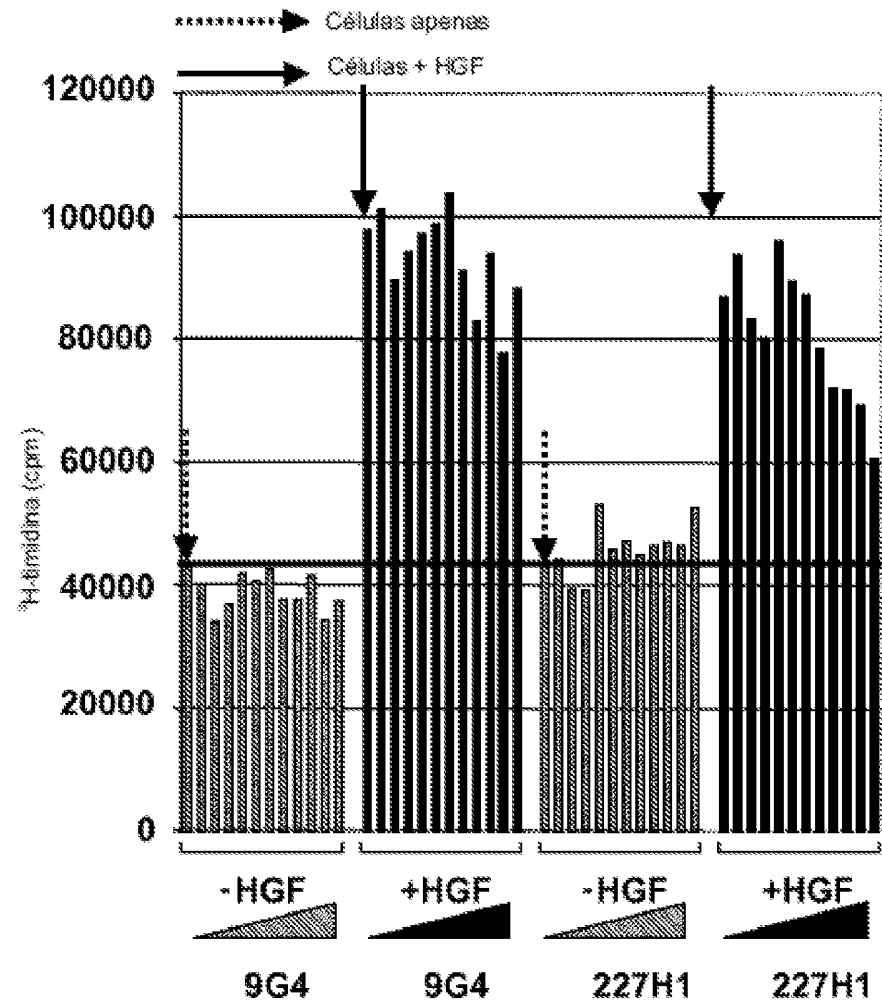


FIGURA 2B

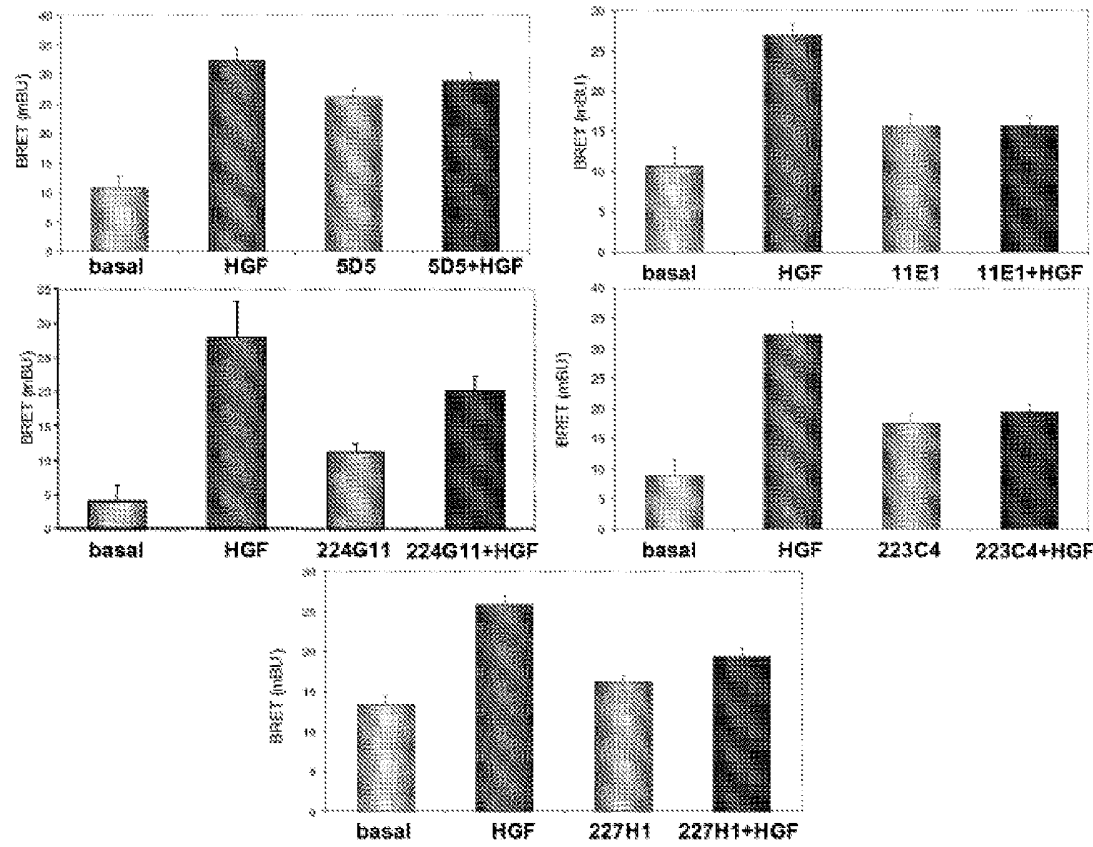


FIGURA 3

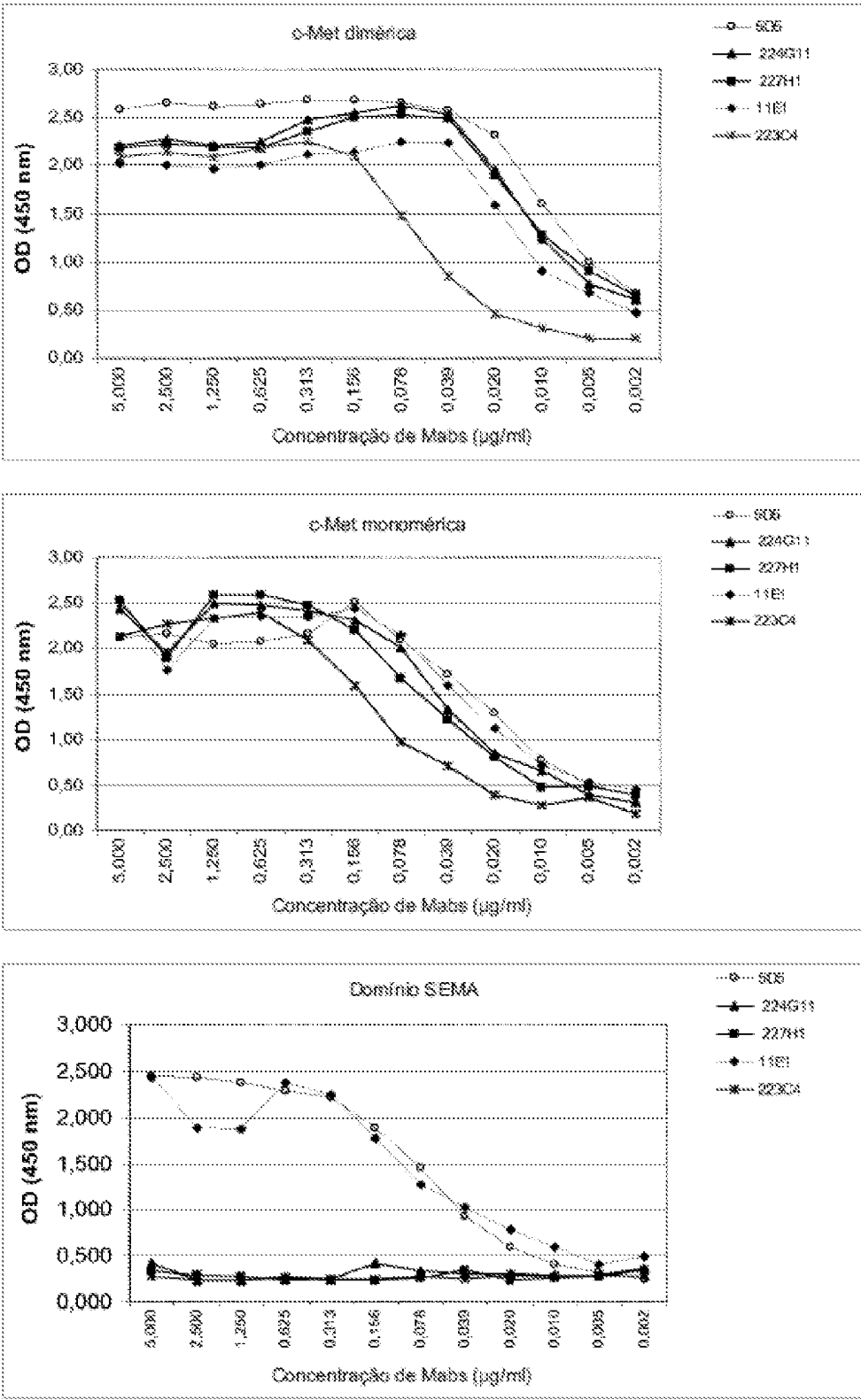


FIGURA 4

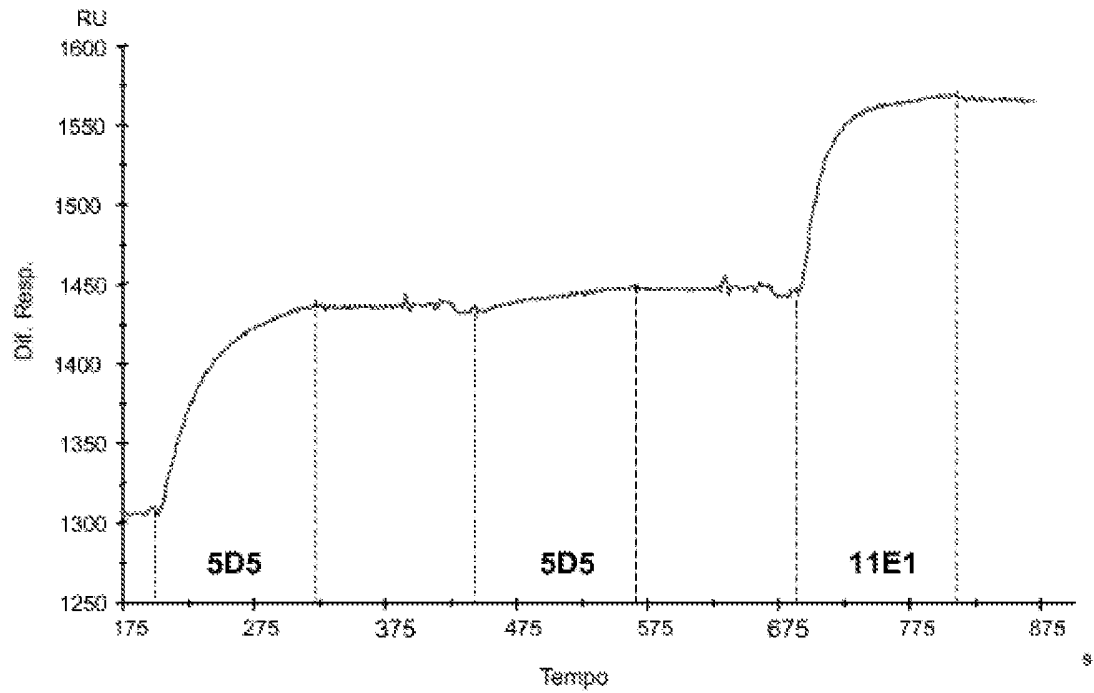


FIGURA 5A

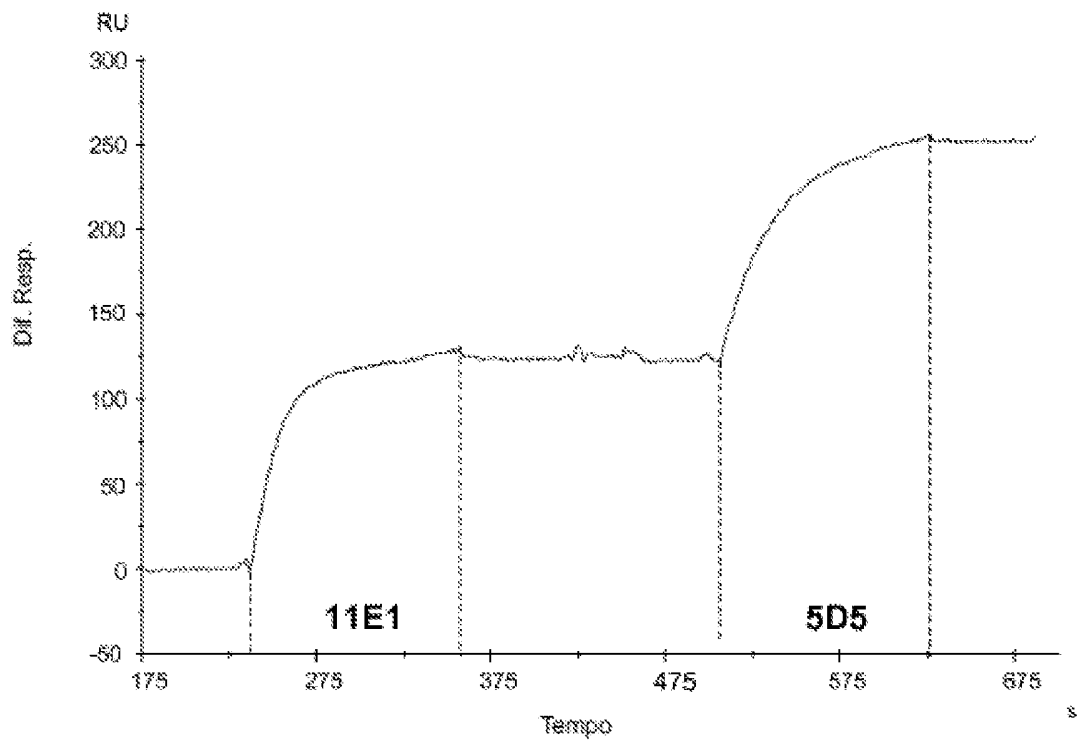


FIGURA 5B

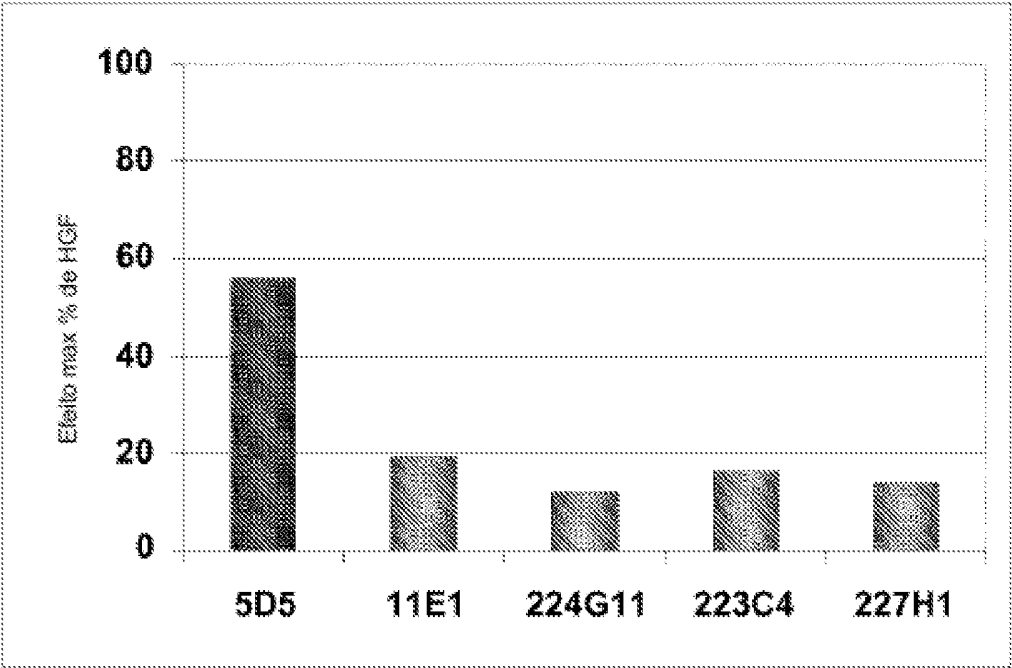


FIGURA 6A

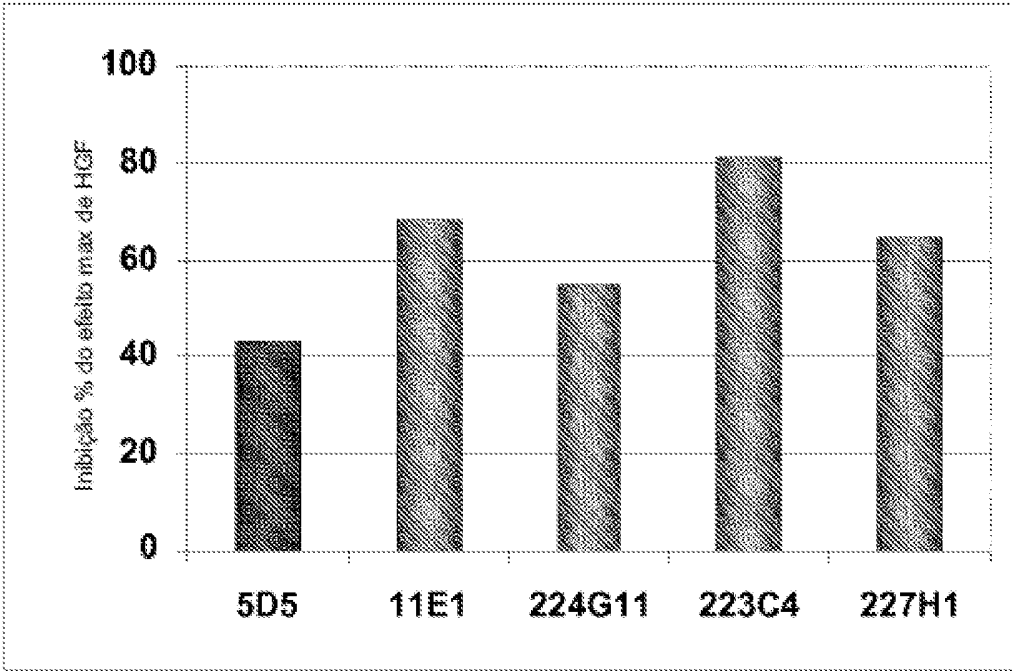


FIGURA 6B

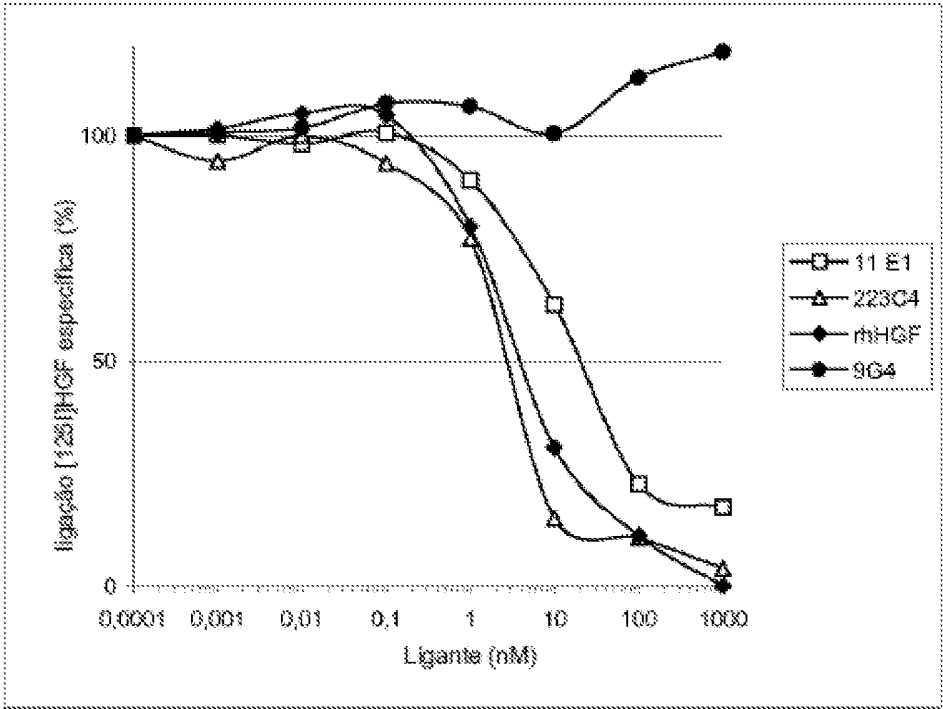


FIGURA 7A

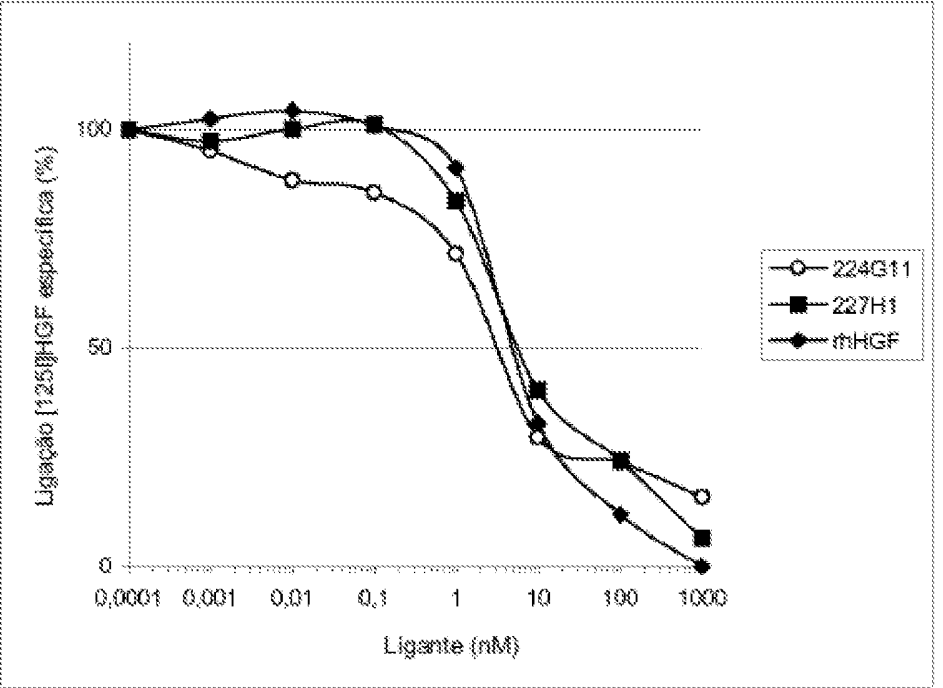


FIGURA 7B

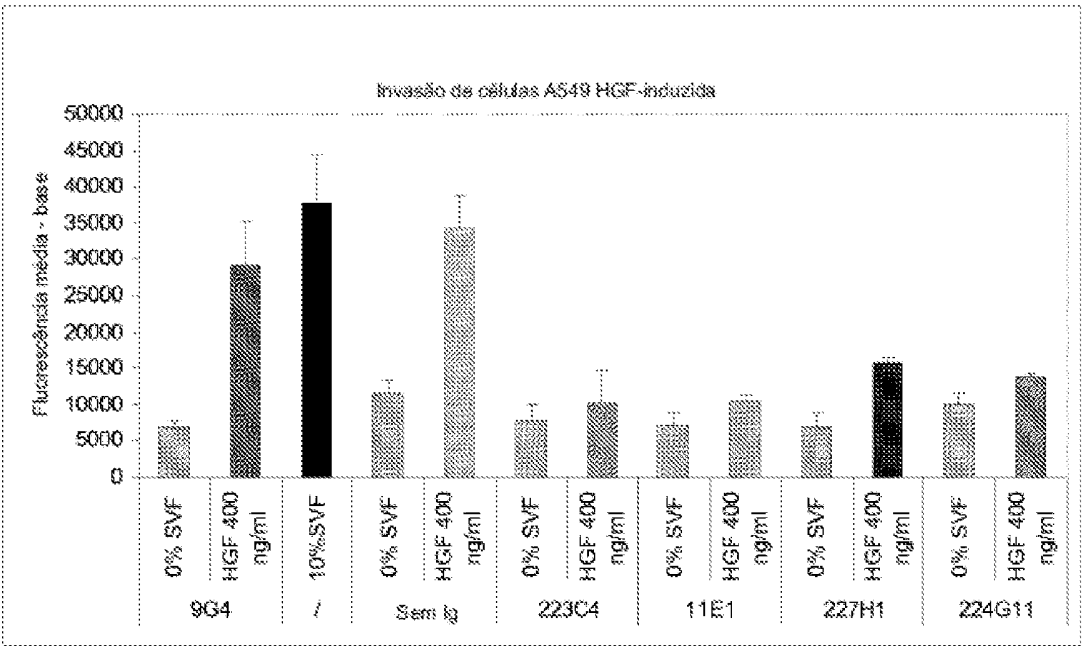
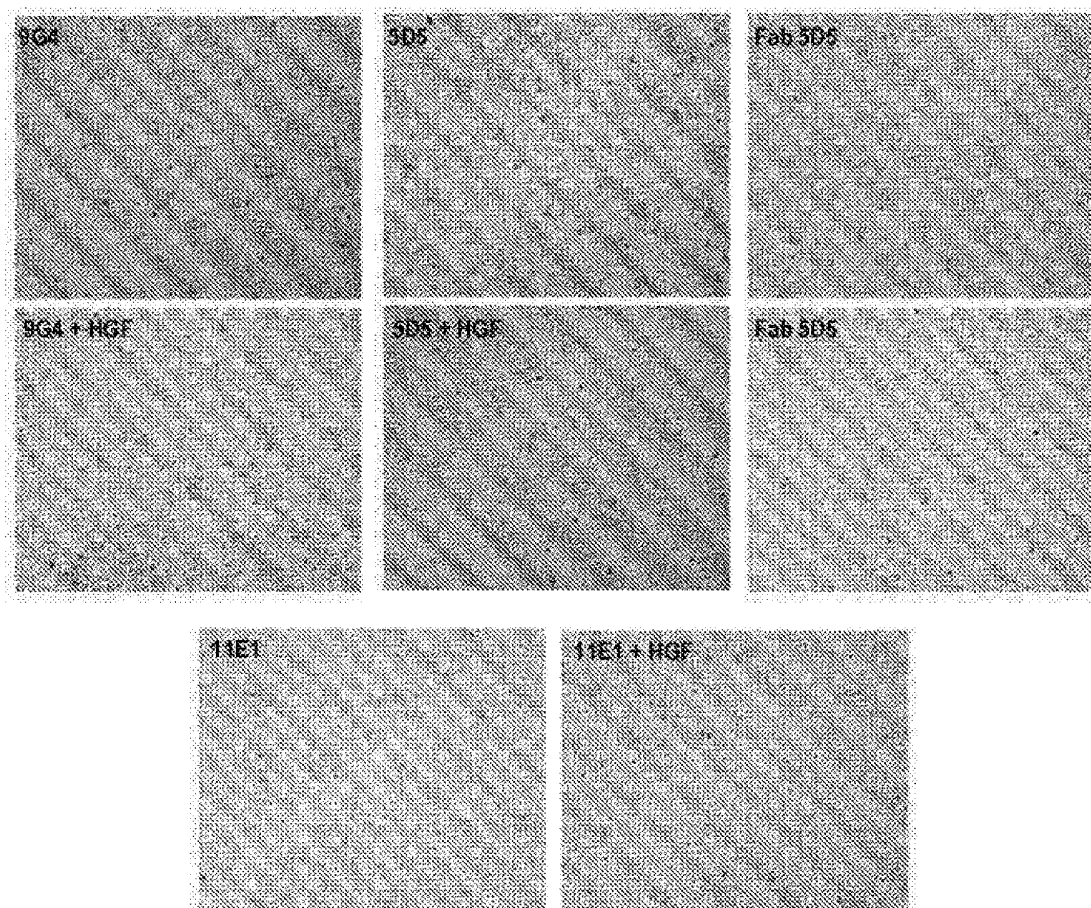


FIGURA 8

**FIGURA 9**

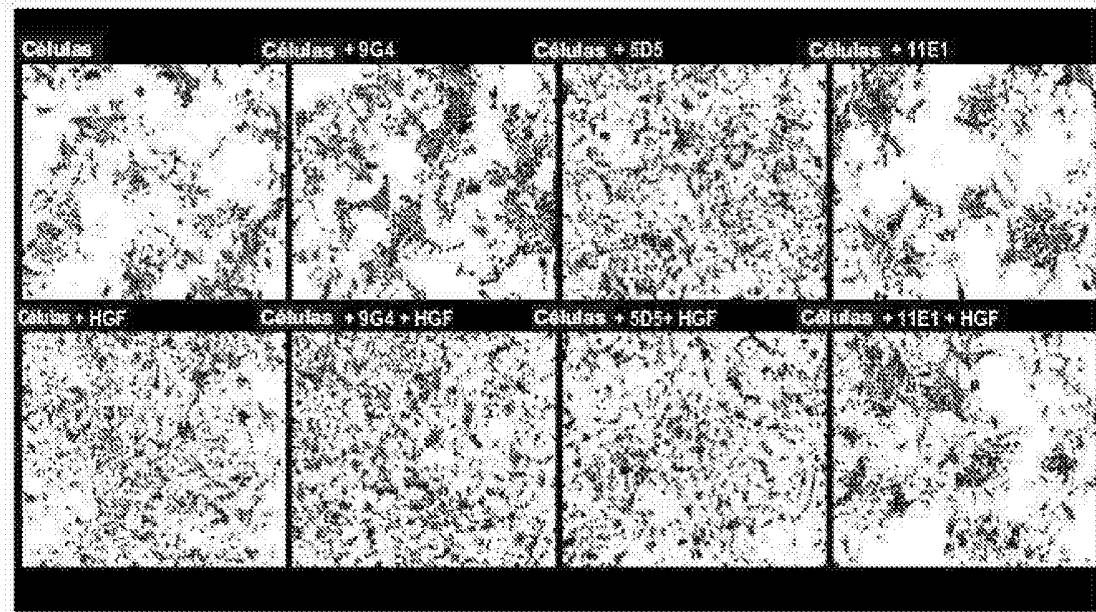


FIGURA 10A

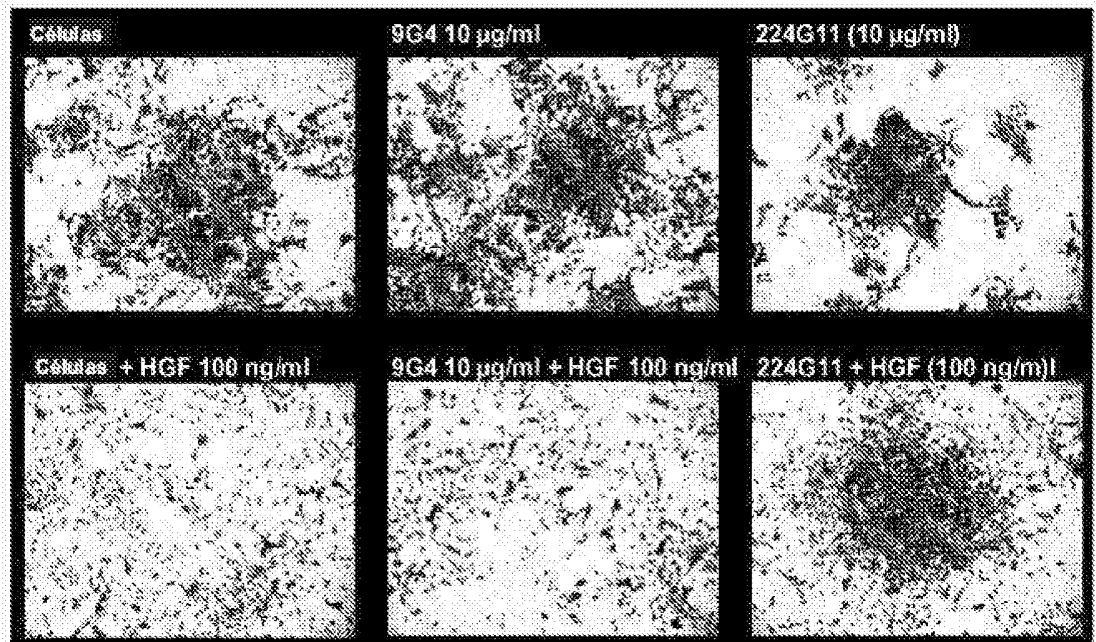


FIGURA 10B

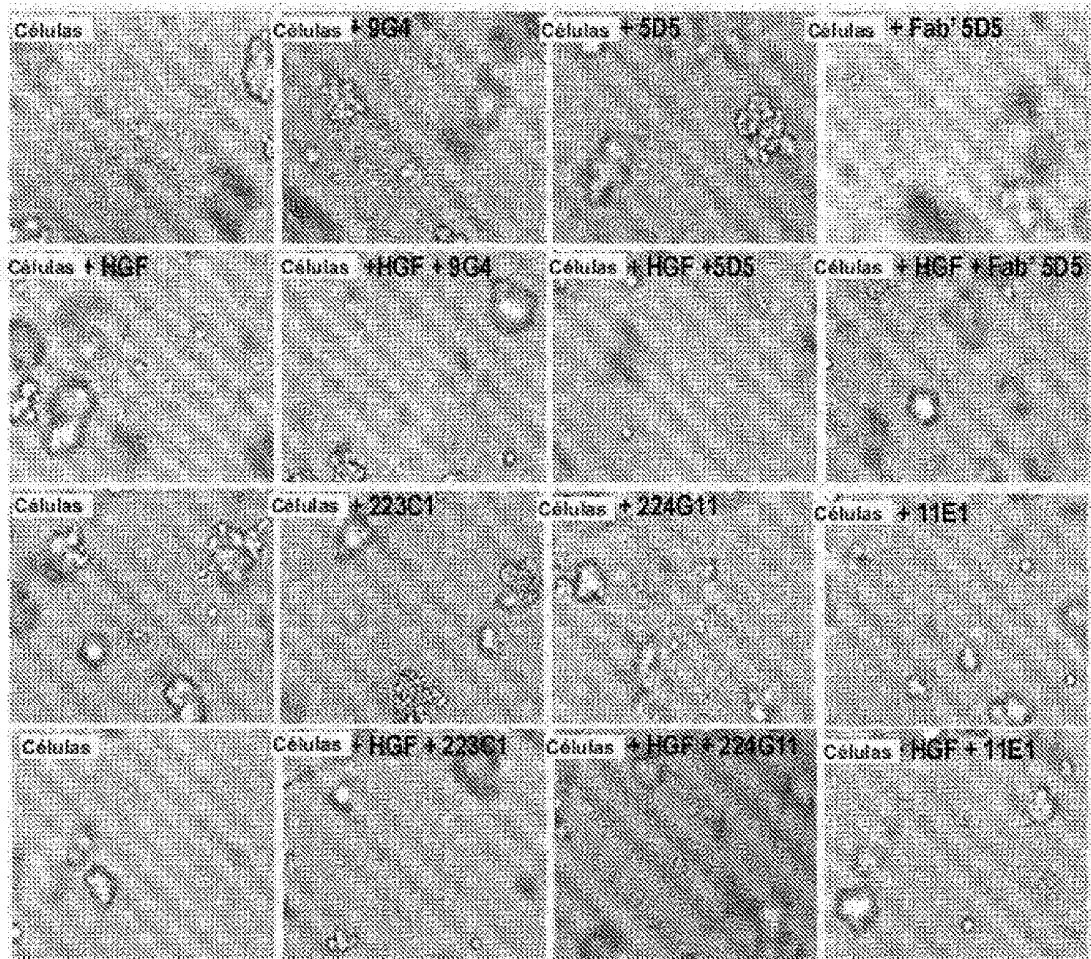


FIGURA 11

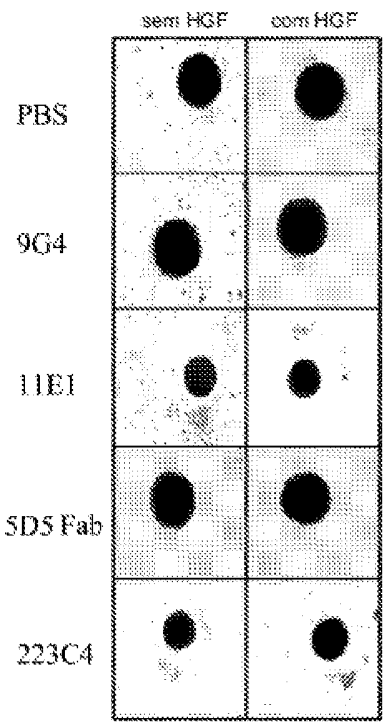


FIGURA 12A

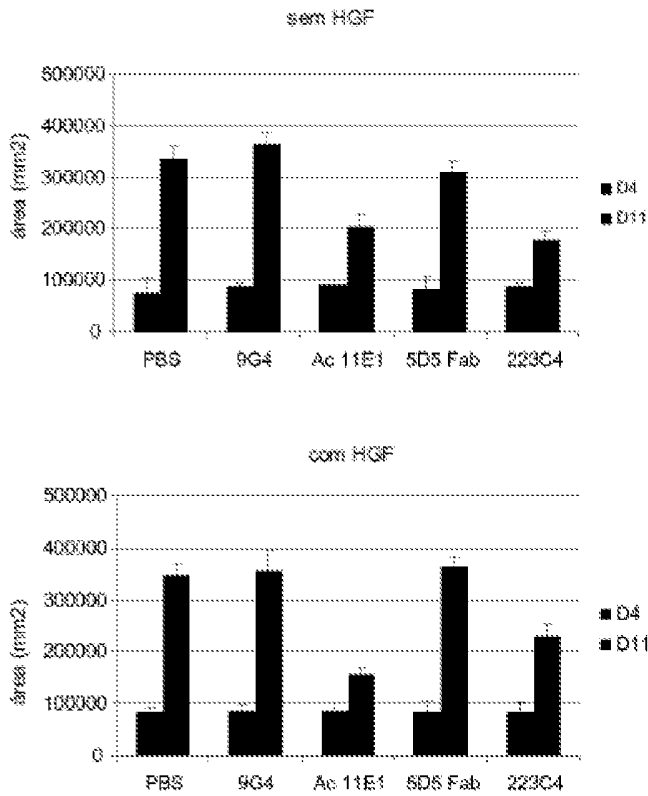


FIGURA 12B

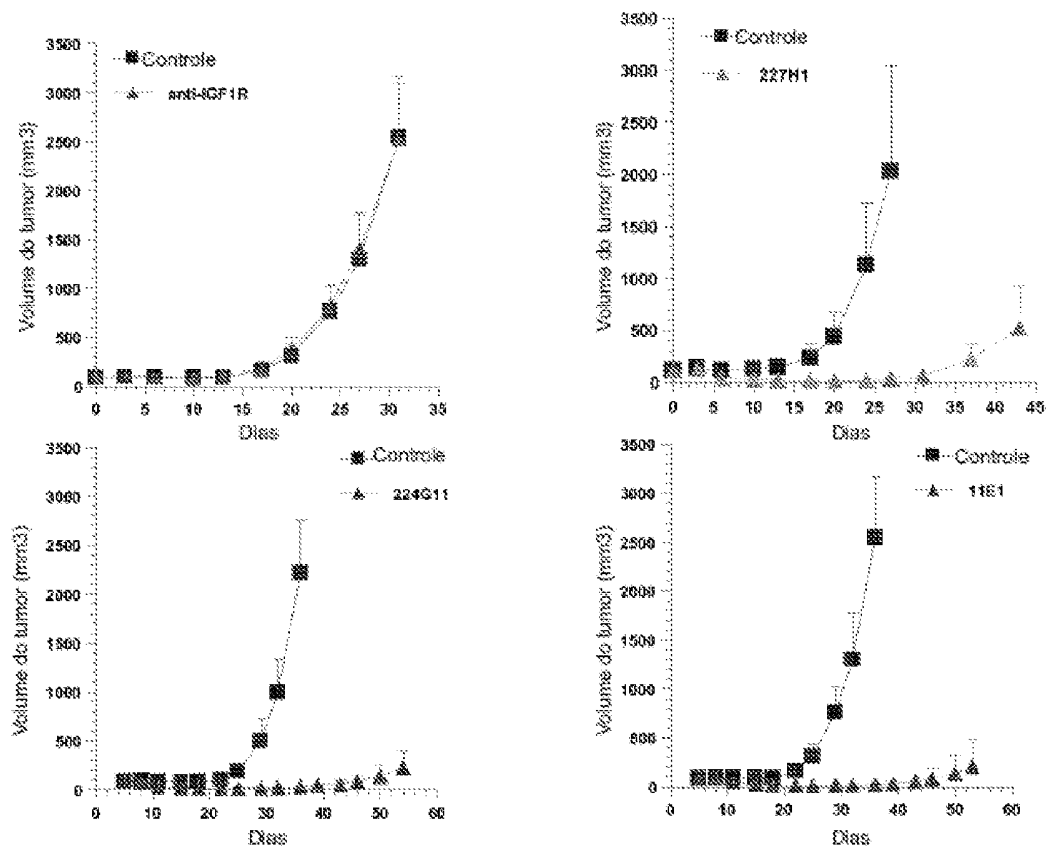


FIGURA 13

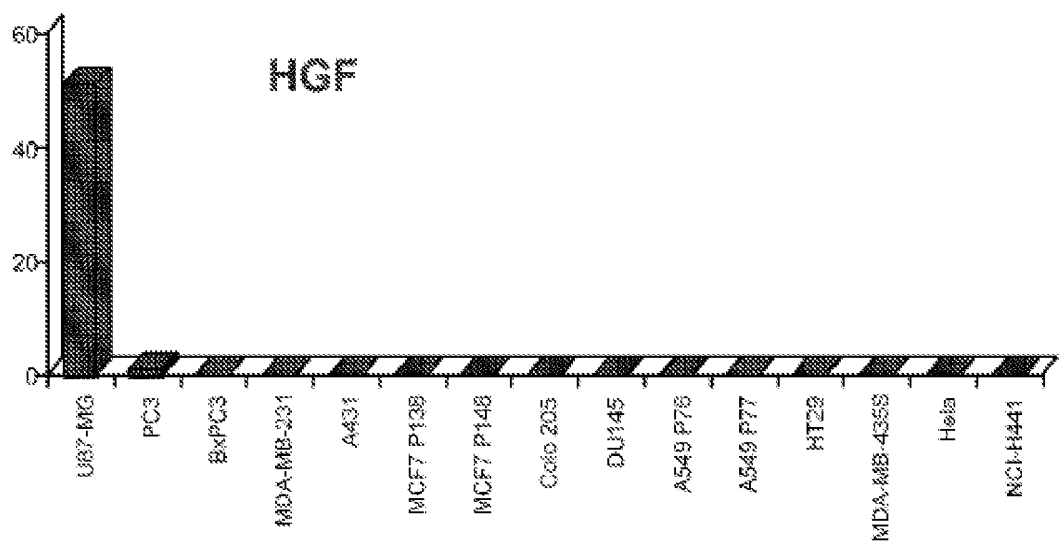


FIGURA 14

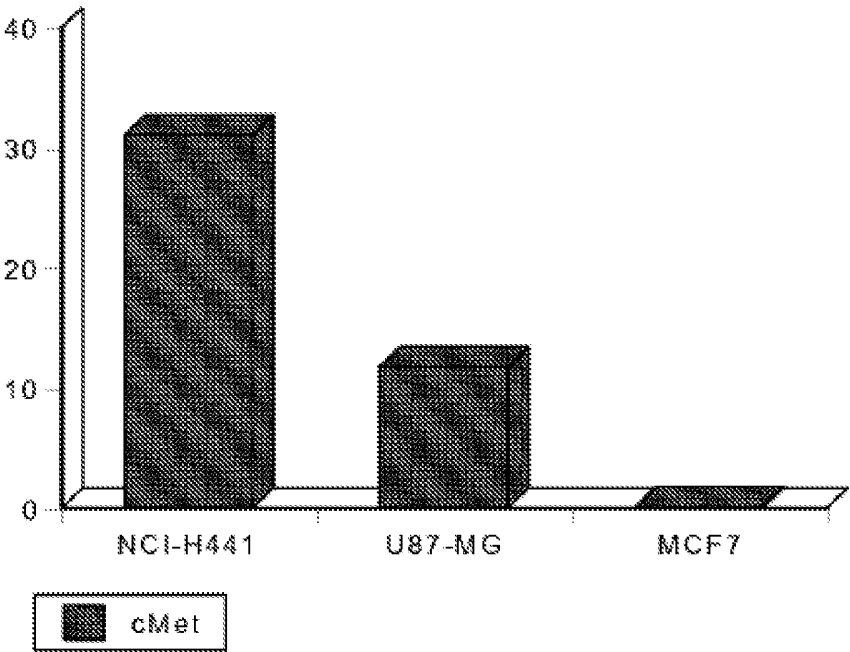


FIGURA 15A

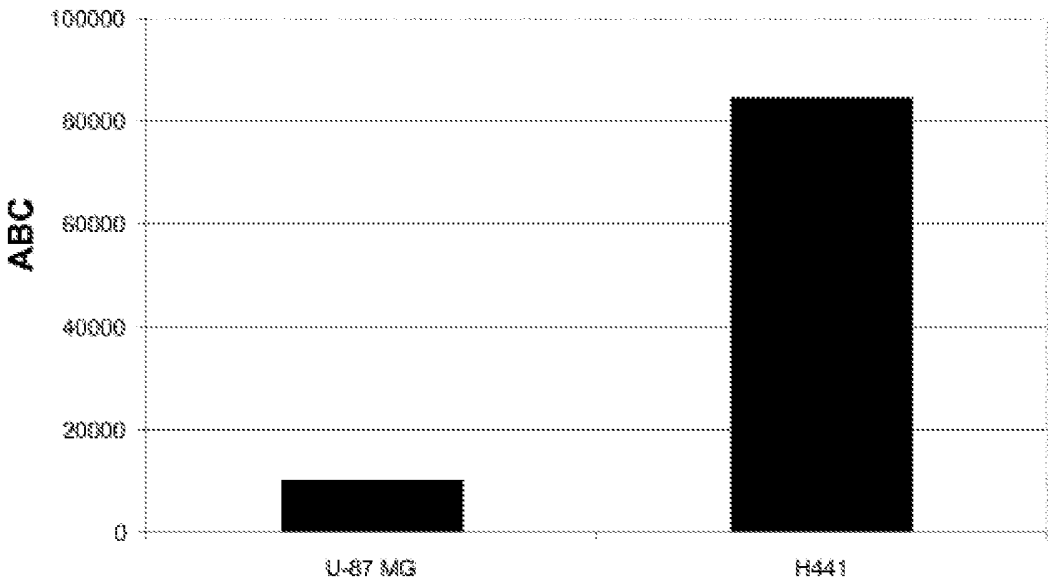


FIGURA 15B

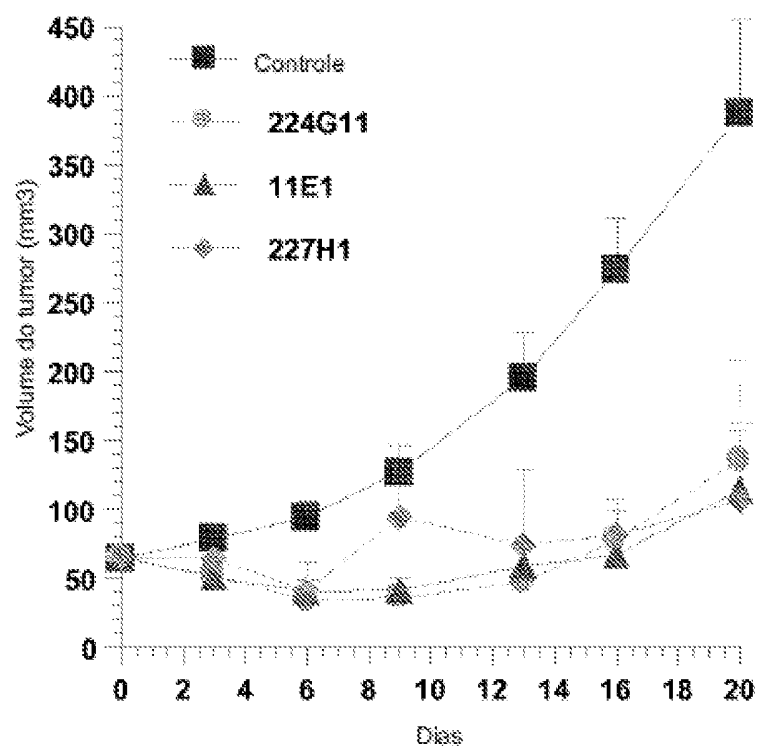


FIGURA 16

```
<----- PK1 - IMGT
1 5 10 15
D I V L T Q G F A S L A V G L
gac att gtc atg acc gaa tat cca gct tat ttc ggt gtc tat cta
-----
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
----->
20 25 30
G Q R A T F S C R A S H S V C
ggg cag agt gcc acc ata tcc tgc aag ccc agt gaa agt gtt ggt
---
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
-----
CDR1 - IMGT <-----
35 40 45
G Y A N S P R H W Y Q Q K
agt tat gcc aat agt ttt ... .. atg cag tgc tac cag cag aag
G
---
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
-----
PK2 - IMGT <----- DLR2
50 55 60
P G Q P F N L L I Y R A S
cca gga cag cca ccc aac ctc atc atc tat cgt gca tcc ... ..
---
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
-----
- IMGT <-----
65 70 75
N L E S Q I P A G
... .. aac ata gaa tat ggg atc aat ... gcc agt
... ..
-----
FR3 - IMGT <-----
80 85 90
P S G S G S A E D F T L T
ttc agt gcc agt ggg ... .. tct agt aca gac ttc acc ctc acc
---
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
----->
95 100 105
I N D V E A D D V A T Y Y C Q
att aat acc gta gag ggt aat gat gtt gca acc tat ttc tat aag
---
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
-----
CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT
110 115 120
Q S K E D P L T F G S G T E L
cca agt aag gag gcc aat atc aag ttc gcc tgc agt acc aac ttc
N
---
224G11 VL
X02161 IGKV3-5*01
----->
123
E N E
gaa atg aag
224G11 VL
```

FIGURA 17A

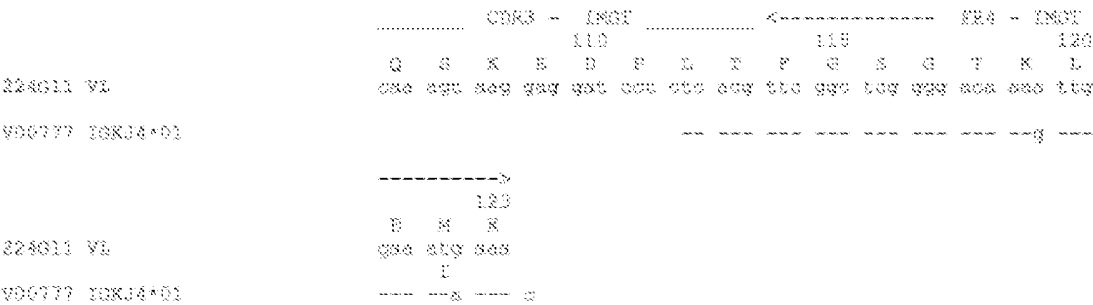


FIGURA 17B

FIGURA 18A

```

                CDR3 - INGT                <----- EB4 - INGT ----->
                110                115                120
      Q   S   K   E   D   P   L   T   P   G   S   G   T   K   L
224011 VL  aa a g t a a g g a g g a t c c t a t a a g t t c g g c t a g g g a c a a a t t g
                G                V
AP103571 IGKJ4*02                -- a a a a a g g a a a a a a a g g a a

----->
                123
      E   M   K
224011 VL  g a a a t g a a a
                I
AP103571 IGKJ4*02  -- g -- c -- a a
```

FIGURA 18B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
224G11 VL	DI V LTQSPAS L AVSLGQ R ATISCRAS	ESVDSYAN S F..	M HWYQ K PGQ P PKLLIY	RAS.....
FR humana	333233		1123	
224G11 NZ1VL	E-----T-SL-P-E--L-----	LA-----A-R-----
224G11 NZ1VL	RIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	ESVDSYAN S F..	M HWYQ K PGQAPRLLIY	RAS.....
	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)	
	708090100	110	120	
224G11 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEAD S VATYYC	Q S KEDPLT	PGSGTKLE M K	
Classificação	22313233323		333	
FR humana	-RAT-----G-----SSL-PE-F-V---		--G---V-I-	
224G11 NZ1VL	NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISLSPEDFAVYYC	Q S KEDPLT	PGSGTKVEIK	

FIGURA 19A

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
224G11 VL	DI V LTQSPAS L AVSLGQ R ATISCRAS	ESVDSYAN S F..	M HWYQ K PGQ P PKLLIY	RAS.....
FR humana	133332		11	
224G11 NZ2VL	DI V MTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESVDSYAN S F..	LAWYQ K PGQ P PKLLIY
224G11 NZ2VL	DI V LTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESVDSYAN S F..	M HWYQ K PGQ P PKLLIY	RAS.....
	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)	
	708090100	110	120	
224G11 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEAD S VATYYC	Q S KEDPLT	PGSGTKLE M K	
FR humana	223331323333		333	
224G11 NZ2VL	TRSSGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAE D VAVYYC	Q S KEDPLT	PGSGTKVEIK	
224G11 NZ2VL	TRSSGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAE D VAVYYC	Q S KEDPLT	PGSGTKVEIK	

FIGURA 19B

FIGURA 20A

224611 VH
300431 1GR02-4*01

CDR3 - IMGT

105110115

A R S E I T T E F D Y

gaa aga tat gag att acg acg gaa ttt gac tac

a--- at- ---- --- --

FIGURA 20B

224611 VH
V00770 1GR12*01

CDR3 - IMGT

110115120

R S E I T T E F D Y W G Q G T

aga tat gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc aca ggc acc

y

... .. ,50 T+0 *** **

224611 VH
V00770 1GR12*03

EX4 - IMGT

126

A L V V E S

ggt ctg aca ggc tcc tca

T

a-- --- --- --- --- -- g

FIGURA 20C

FIGURA 21A

FIGURA 21B

	FRI~INGT (1~26)				CDR1~INGT (27~38)				FR2~INGT (39~55)				CDR2~INGT (56~65)			
	1	10	20		30		40	50		60						
224G11 VH
Classificação	EVQLQQSGP	ELVKPGASVKISCKT	GYIFTAYT...	MSRWVQ	SLGESLDWIG	IKPNNGLA..										
FR humana	3 3 3 33	3 2		33 22 1 2 1												
224G11 H2VH	Q---V---A--VK-----V---A--	-----AP-QG-E-N-W														
	GVQLVQSGA	EVKRPGRSVKVSCKAS	GYIFTAYT...	MSRWVQ	APGGGLDWIG	IKPNNGLA..										
	FR3~INGT (66~104)				CDR3~INGT (105~115)				FR4~INGT (116~126)							
	70	80	90	100	110		120									
224G11 VH
Classificação	RYNQKPK	GKATLVDRSSSTAYMDL	ASITSEDSAVVYC	ARSEITTEFDY	WGQGTALT	VSS										
FR humana	3 3 32 3 1 1 3	2 33 3 3 3		33												
224G11 H2VH	--A---Q--RV-N-R-T-I-----E-ER-R-D-T-----	-----LV-----														
	NYAQKPK	GRVTMTVDRSISTAYMEL	SLRLASDSTAVVYC	ARSEITTEFDY	WGQGTALT	VSS										

FIGURA 22

FIGURA 23A

```

..... CB&3 -- IMPT ..... <----- PR4 -- (MPT
                               110             115             120
Q   S   N   E   D   P   P   T   P   G   S   G   T   W   L
caa agt aat gag gat caa tta aay tta ggc tgg ggg aas aag tgg
V00777 158234*G1
-----
----->
                               123
B   M   K
caa atg aaa
I
V00777 16874*G1
*** **B *** C
```

FIGURA 23B

```

----->
1 5 10 15 20 25 30
G E V L F Q S P A S C A V A L
ggc att ggc ttg acc cca tat cca ggt tat ttc ggt gtg tat cta
E
--aa ---- ---- --a --g ---- --c a-c c- t- t- --c-
G M P
----->
1 5 10 15 20 25 30
G Q R A T L S C R V S E G I D
gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc sgt gaa agt att gat
E
--g g-g --g --g --g g-g --g --g --g --g --g --g --g --g
E N K S Q V
----->
1 5 10 15 20 25 30
T Y C N S F I H W Y Q Q K
acc tat ggc acc agt ttc ... .. ata acc tgg tcc cag cag acc
G
--gc --c ... .. --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c
Y C G N K N Y L X
----->
1 5 10 15 20 25 30
P G Q P P K L L I Y R A E
cca gga cag cca acc acc ctc ctc atc tat tat gaa tcc ... ..
A K
--c --c --c g-c --g --g --g --g --g --g --g --g --g
W
----->
1 5 10 15 20 25 30
... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
T K V D
----->
1 5 10 15 20 25 30
P G G S G ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
acc agt ggc agt ggg ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... ..
G
----->
1 5 10 15 20 25 30
T N E V E A D G S A T Y Y C Q
att aat cct gtg gag ggt gat gat tat gaa acc tat ttc tat cag
S S L P E P Y
--c --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c --c
S S L Q B V Y
----->
1 5 10 15 20 25 30
G S N E D F F T F G S G T K L
cca agt aat gag gat acc ttc acc ttc ggc tgg ggc acc gag ttc
R G N W
--g --g --g --g --g --g --g --g --g --g --g --g --g --g
----->
1 5 10 15 20 25 30
S M K
gga tgg acc

```

FIGURA 24A

```

----- CURS - INGE ----- <----- ER4 - INGE -----
                                110                                115                                120
                                Q   S   B   E   D   P   F   T   E   G   G   G   T   K   L
22781 VL                      oos oot oot oos oot oos tto oos tto oos tto oos oos oos tto
                                L                                     G                                     Y
AF103971 1GXJ4*02                      g o-- --o --o --o oga --o --o --o g--

----->
                                123
                                E   N   K
22781 VL                      oas atg asa
                                I
AF103971 1GXJ4*02                      --g --o --o o

```

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)				FR2-IMGT (39-55)				CDR2-IMGT (56-65)			
	1	10	20		30			40	50			60				
227H1 VL	
	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS				ESIDTYGNSF..				IHWYQQKPGQPFKLLIY RAS						
	3	3	33	2	3	3	2	11	2	3						
FR humana	E-----T-SL-P-E-----L---A-							LA-----A-R-----						
227H1 H21VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKAS				ESIDTYGNSF..				IHWYQQKPGQAPRLIY RAS						
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)				FR4-IMGT (114-123)							
	70	80	90	100	110	120										
227H1 VL	
	NLESGIP.ARFSGSG..SRIDFTLTINPVEADDSATYYC				QQSNEDPFT				PGSGTLEMK							
	223	1	323	33	2	3			3	3	3					
FR humana	-EAT---G-----SSL-PE-F-V---				-----				--G---V-I-							
227H1 H21VL	NRATGIP.ARFSGSG..SRIDFTLTISGLEPDAVYYC				QQSNEDPFT				PGSGTVEIK							

FIGURA 25A

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)				FR2-IMGT (39-55)				CDR2-IMGT (56-65)			
	1102030				30405060											
227H1 VL	GIVLTQSPASLAVSLGQQRATISCRVS				ESIDTYGNSF..				IHWYQQKPGQPPKLLIY RAS							
	3	1	3	3	3	32			11							
Human FR	DIVMTQSPESLAVSLGERATINCKSS								LAWYQQKPGQPPKLLIY							
227H1 H22VL	DIVLTQSPESLAVSLGERATINCKSS				ESIDTYGNSF..				IHWYQQKPGQPPKLLIY RAS							
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)				FR4-IMGT (114-123)							
	708090100				110120											
227H1 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRIDFTLTINPVEADDSATYYC				QQSNEDPFT				PGSGTKLEMK							
	22	3	3	1	3233	3	3		3	3	3					
Human FR	TRSGGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQASDVAVYYC								PGSGTKVEIK							
227H1 H22VL	TRSGGVP.DRFSGSG..SRIDFTLTISLQASDVAVYYC				QQSNEDPFT				PGSGTKVEIK							

FIGURA 25B

```

<----- FR1 - IMGT ----->
      1          5          10          15
      E V Q L Q Q S G F      E L V E F
227B1 VH gag gtc aag ctg aca cag tat gga aat ... gaa ctg gtc aag aat
AC030843 IGHV1-18*01
----->
      20          25          30
      G A S M K E S C N A S G Y E H
227B1 VH ggc gct tcc atg aag att tcc tgc aag gat tat ggt tat tca ttc
      V          P          T
AC030843 IGHV1-18*01 --g --g --a c-- --a --c a--

      CDRL - IMGT ----->
      35          40          45
      T S P T      L N W V K Q E
227B1 VH aat gac tcc aac ... ... ctg aac tgg gtc aag cag aag
      S      M D
AC030843 IGHV1-18*01 --- --a- ... --a- a- g- --- --a- ---

      FR2 - IMGT -----> CDRL2
      50          55          60
      B G K T L E W E G L I N E Y N
227B1 VH aat gga aag aca cct gag tgg att gga att att aat cct tca aat
      G      D      N
AC030843 IGHV1-18*01 --- --g- --- --a- --- --a- --- --a- ---

      - IMGT ----->
      65          70          75
      G S T      F Y N Q K F K      G E
227B1 VH ggt ggt aat ... ... aac tcc aac cag aag ttc aag ... ggc aag
      I
AC030843 IGHV1-18*01 --- --a- --- --a- --- --a- --- --a- ---

      FR3 - IMGT ----->
      80          85          90
      A T L T V D K S S G T A Y M E
227B1 VH gac aca tta aca gta gac aag tca tcc aac aca gcc tcc atg gag
AC030843 IGHV1-18*01 --- --a- --- --a- --- --a- --- --a- ---

      ----->
      95          100          105
      L L S L T E E G S A V Y Y C A
227B1 VH ccc ctg aat ctg aca tcc gag gac tat gca gtc tat tcc tct gac
      A          T
AC030843 IGHV1-18*01 --- --g- --- --a- --- --a- --- --a- ---

      CDRL3 - IMGT ----->
      110          115          120
      R E E I Y K D P G P W G Q G T
227B1 VH aag gac gac att acg aac gac ttt gat ttc tgg ggc aca gcc aac
AC030843 IGHV1-18*01 ---

      FR4 - IMGT ----->
      125
      T L T V S C
227B1 VH aat ctg aca gtc tcc tca

```

FIGURA 26A

227H1 VH
IGHD1-1*02

CDR2 - IMGT
109 110 115
A R E E I T K D F D F
gca aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc
-t- -t- gc- ---

FIGURA 26B

227H1 VH
V00770 IGHJ2*01

CDR3 - IMGT
110 115 120
K E E E T K D F D F W C Q C T
aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc gaa
Y Y
... .. and for ... and ... and ... and ...
FW4 - IMGT
126
T L T V S G
aat ata aca ata cac taa
... .. g

FIGURA 26C

[illegible]

FIGURA 27A

		CDR3 - IMGT										FR4 - IMGT									
		110										115									
		R	E	E	I	T	K	D	F	D	F	W	G	Q	G	T					
227H1 VH		aga	gag	gaa	act	acg	gag	gac	ctt	gat	tta	tgg	ggc	gaa	ggc	acc					
							X				X										
300256 IGH74*01	
		126																			
		T	L	T	V	S	S														
227H1 VH		act	ctc	aca	gtc	taa	caa														
		L	V																		
300256 IGH74*01		ctg	g--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

FIGURA 27B

	FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38)					FR2-IMGT (39-55)					CDR2-IMGT (56-68)				
	1	10	20			30				40	50			60						
227H1 VH	EVQLQSGSP	ELVRFGAS	DKISCKAS			GYSTDTYT	...			LNNVRS	SHGKTL	EWIGL		INPYNGST	..					
Classificação	3	3	3	33	3	3				11	3	33	22	2	1					
FR humana	Q---V---A-	VK-----V-V-----								MR---R-AP-QG---	M-W									
227H1 H2VH	QVQLVQSGA	EVKIPGAS	VRVSCAS			GYSTDTYT	...			LNNVRS	QAPGQGLE	WNGL		INPYNGST	..					
	FR3-IMGT (66-104)					CDR3-IMGT (105-115)					FR4-IMGT (116-126)									
	70	80	90	100		110		120												
227H1 VH	TYNQRFK	GRATLVSK	SSGYAYMELLS	ITSSAVYYC		AREEITKSDPF		WGQGTITLVSS												
Classificação	1	3	3	32	2	1	1	3	33	3	3			33						
FR humana	N-A---	Q-	SV-M-R-T-I	-----	GR-R-D-T	----								---	EV---					
227H1 H2VH	TYAQKFK	GEVTMTVSK	SISTATMELSEL	RSDDTAVYYC		AREEITKSDPF		WGQGTITLVSS												

FIGURA 28

FIGURA 29A

FIGURA 29B

```

VL 22304          <----- FR1 - INGT ----->
                   1      5      10      15
                   G   L   Q   N   T   Q   S   P   A   S   L   S   Y   S   V
gag atc cag atg act cag tat ccs ggc tcc cta tat gta tat ggg
                   S
----->
                   20      25      30
                   G   E   T   V   T   I   T   C   R   A   S   E   N   I   Y
gga gaa act gtc acc atc acc tgt aga gga agt gag aat att tac
                   D   E
--->
VL 22304          <----- FR2 - INGT ----->
                   35      40      45
                   G   N   L   A   W   Y   Q   Q   R
agt aat ... .. tta gga tgg tat cag cag aag
                   F   S
--->
VL 22304          <----- FR3 - INGT ----->
                   50      55      60
                   Q   G   K   S   P   Q   L   L   Y   X   A   R   T
cag gga aag tat cct cag atc atg gta tat ggt cca acc ... ..
                   F   A   K   L   S
--->
VL 22304          <----- FR4 - INGT ----->
                   65      70      75
                   N   L   V   G   G   V   P   S   R
... .. gac tta gta gac ggt gta cca ... tca agc
                   R   E   S
--->
VL 22304          <----- FR5 - INGT ----->
                   80      85      90
                   F   S   G   S   G   S   S   T   Q   Y   S   L   K
tcc agt gga agt gga ... .. tca ggc aag aag tat tcc cta aag
                   S   D   T
--->
VL 22304          <----- FR6 - INGT ----->
                   95      100      105
                   I   N   S   L   Q   S   E   D   P   G   S   Y   Y   C   Q
atc acc acc atg cag tat gaa gat att gga agt tat tac tgt aag
                   S   F   R
--->
VL 22304          <----- FR7 - INGT ----->
                   110      115      120
                   N   F   W   G   P   P   Y   Y   F   G   S   S   Y   K   L
aat ttt tgg ggc atc cag taa aag ttc gga gga gga acc aag atg
                   Q   F   E   G   T
--->
VL 22304          <----- FR8 - INGT ----->
                   125      130      135
                   G   P   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K
agt acc cag taa aag ttc gga gga gga acc aag atg gga ata aag
                   Q
--->
VL 22304          <----- FR9 - INGT ----->
                   140      145      150
                   G   P   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K
agt acc cag taa aag ttc gga gga gga acc aag atg gga ata aag
                   Q
--->

```

FIGURA 30A

```

VL 22304          <----- FR10 - INGT ----->
                   155      160      165
                   G   P   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K
agt acc cag taa aag ttc gga gga gga acc aag atg gga ata aag
                   Q
--->
VL 22304          <----- FR11 - INGT ----->
                   170      175      180
                   G   P   P   Y   T   F   G   G   G   T   K   L   E   I   K
agt acc cag taa aag ttc gga gga gga acc aag atg gga ata aag
                   Q
--->

```

FIGURA 30B

		<----- FR1 - IMGT ----->											
		1			5			10			15		
Hx VL 22304		D	C	Q	M	T	Q	S	F	S	S	L	S
		<----->											
					20			25			30		
Hx VL 22304		G	D	H	V	T	I	T	C	R	A	G	H
		<----- CDR1 - IMGT ----->											
					35			40			45		
Hx VL 22304		S	N					L	A	W	Y	Q	Q
		<----- FR2 - IMGT ----->											
					50			55			60		
Hx VL 22304		P	G	K	A	P	K	D	L	D	Y	A	A
Re-mutação		Q			S		Q						
		Q			2		2						
		<----->											
					65			70			75		
Hx VL 22304						R	L	E	S	G	V	E	
Re-mutação						N		V	D				
						1		1	2				
		<----- FR3 - IMGT ----->											
					80			85			90		
Hx VL 22304		F	D	G	E	D		S	G	T	D	Y	T
Re-mutação											Q		
											2		
		<----->											
					95			100			105		
Hx VL 22304		I	S	H	D	Q	P	R	D	P	A	T	Y
Re-mutação			N			A						Y	C
			2			3							Q
		<----- CDR3 - IMGT ----->											
					110			115			120		
Hx VL 22304		H	P	W	G	P	D	Y	T	F	G	Q	G
		<----- FR4 - IMGT ----->											
					123								
Hx VL 22304		E	I	K									

FIGURA 31

----- FR1 - IMGT -----
1 5 10 15
E V L L Q Q S G P E L V K P
gag ggc ctg ctg aca cag tct gga cct ... gag ctg gtc aag cct
Q
... ..
----->
20 25 30
G A S V K E P C E A S G Y T P
ggg ggt tca gtc aag ata ccc tgc aag ggt tct gga tac aca ttc
... ..
----- CDR1 - IMGT -----<-----
33 40 45
T D Y S M D W V K Q S
act gac cac aac atg gac tgg gtc aag cag agc
... ..
----- FR2 - IMGT ----->----- CDR2
50 55 60
H G M S L E W I S G I N P N S
cct gga atg agc cct gag tgg att gga gat act aat cct aac aat
K
... ..
----- - IMGT -----<-----
63 70 75
S G T I F N Q F F S G K
ggc ggc act ccc ttc aac cag aag ttc aag ... ggc aag
Y
... ..
----- FR3 - IMGT -----
80 85 90
A T L Y V Q E S S E T A Y M E
gca aca ttg act gta gca aag tcc tcc agt aca ggc tac atg gag
... ..
----->-----
95 100 105
L B S L T S E D T A V Y Y Q A
ctc cgc agc cag aca tct gag gac aca ggc gtc tat tcc tgt gaa
... ..
----- CDR3 - IMGT -----
110 115
R G R Y V G Y Y Y A M D Y
aga ggg agg tat gtt ggt tcc tac tat gct atg gac tac
D
... ,tc --- -a- --- --- ---

FIGURA 32A

----- CDR3 - IMGT -----
110 115
R G R Y V G Y Y Y A M D Y
aga ggg agg tat gtt ggt tcc tac tat gct atg gac tac
D
... ,tc --- -a- --- --- ---

FIGURA 32B

```

----- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT ----->
              115              125              135              145
G  Y  Y  Y  A  K  D  Y  W  S  Q  S  T  S  V  T  V  S  S
VN 223C4  ggt tac tac tat ggt atg gac tac tgg ggt cca gga acc tca gtc acc gtc tac tca
V03Y70 IGHJA*01  at *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** ***

```

FIGURA 32C

```

<----- FR1 - IMGT ----->
1          5          10          15
E  V  L  L  Q  Q  S  S  P  E  L  V  K  P
VN 223C4  gag gtc ctg ctg caa cag tat gga ctt ... gag ctg gtc sag ctt
G          Q          A          V  K
X62106 IGHV1-2*02  *** gag aga *** ctg *** *** gag gaa ... *** gag aga *** ***

----->
          20          25          30
Q  A  S  V  K  I  P  C  K  A  S  Q  Y  T  F
VN 223C4  ggg gct tca gtg sag ata ccc tgc sag gct tat gga tac acc ttc
          V  S
X62106 IGHV1-2*02  --- --c --- --c s t--- --- --- --- --- --c ---

----- CDR1 - IMGT -----<-----
          35          40          45
T  D  Y  N          M  D  W  V  K  Q  S
VN 223C4  act gac tac aac ... .. atg gac tgg gtc aag cag aga
          Q  F          H          P  K
X62106 IGHV1-2*02  ---c---g--- t-t ... .. ---c--- ---c--- oga ---gc---

----- FR2 - IMGT ----->----- CDR2 -----
          50          55          60
H  G  M  S  L  E  W  I  Q  D  I  N  P  N  N
VN 223C4  ccc gga atg agc ctt gag tgg att gga gat atc aat ctt acc aat
          P  Q  S          M  W          S
X62106 IGHV1-2*02  -c---cag g-g --- --- --g ---cgg --c --c --- --g-

----- IMGT -----<-----
          65          70          75
S  G  T          I  F  N  Q  K  F  K  G  R
VN 223C4  ggt ggt aat ... .. atc ttc aac cag aag ttc aag ... gga aag
          N  Y  A          Q          R
X62106 IGHV1-2*02  *** gag *** ... .. gag aat gaa *** *** *** *** *** gag

----- FR3 - IMGT ----->-----
          80          85          90
A  T  L  T  V  D  E  S  S  S  T  A  Y  N  E
VN 223C4  ggc acc tgg act gaa gag aag ccc tcc agc acc ggc tac atg gag
          V  M          P  T          I
X62106 IGHV1-2*02  -t---c---c---cgg ---c---c---c---c---c---c---c---c---c---

----->-----
          95          100          105
L  H  S  L  T  S  E  D  Y  A  Y  Y  Y  C  A
VN 223C4  atc cga agc cug acc tat gag gac act gaa gtc tat ccc tgt gaa
          S  R          R  D
X62106 IGHV1-2*02  gag *** gag *** agc *** gag *** gag *** gag *** gag *** gag

```

FIGURA 33A

VH 22304

X27031 ICHD1-25*01

CDR3 - IMGT

110

R E R Y V

aga gag gag tat att ggt tac tac tat ggt atg gac tac

115

G Y Y Y A R D Y

ggt tac tac tat ggt atg gac tac

-b --- --c --o tac

FIGURA 33B

VH 22304

J60256 ICH16*01

CDR3 - IMGT

110

R Y V G

aga tat gtt ggt

115

E Y Y A M D Y

tac tac tat ggt atg gac tac tgg ggt cca gga acc tca gtc

120

W G C C T S V

gtc --- --g --- --g --- a-g ---

VH 22304

J60256 ICH16*01

CDR3 - IMGT

120

T V S S

acc gtc tca tca

FIGURA 33C

		<div>-----></div>															FR1 - IMGT				
		1			5					10								15			
Hx VH 223C4		Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A			E	V	K	K	F				
Re-mutação		E		L		Q				P					V						
		2		2		2				3					3						
		<div>-----></div>																			
					20					25								30			
Hx VH 223C4		G	A	G	V	K	V	E	C	K	A	E	G	E	T	T	P				
Re-mutação								P													
								G													
		<div>-----<</div>										<div>-----></div>									
		CDRL1 - IMGT																			
					35						40							45			
Hx VH 223C4		T	G	I	N						H	K	R	V	R	Q	A				
Re-mutação											D						S				
											L						L				
		<div>-----></div>										<div>-----></div>									
					50						55							60			
Hx VH 223C4		R	G	Q	G	L	R	R	K	C	W	I	N	P	N	N					
Re-mutação		R		M							D										
		S		2							L										
		<div>-----<</div>										<div>-----></div>									
		FR2 - IMGT										CDRL2									
					65					70							75				
Hx VH 223C4		G	G	T		N	E	A	Q	K	P	Q					S	E			
Re-mutação						I	F														
						L	L														
		<div>-----></div>										<div>-----></div>									
					80						85						90				
Hx VH 223C4		V	T	S	T	R	G	I	S	I	S	T	A	T	M	E					
Re-mutação					V																
					2																
		<div>-----></div>																			
					95					100							105				
Hx VH 223C4		L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	R					
		<div>-----<</div>										<div>-----></div>									
		CDRL3 - IMGT																			
					110						115						120				
Hx VH 223C4		R	G	R	Y	V	G	Y	Y	Y	A	N	D	Y	W	G					
		<div>-----<</div>										<div>-----></div>									
		FR4 - IMGT																			
					125					129											
Hx VH 223C4		Q	G	T	T	V	T	V	S	S											

FIGURA 34

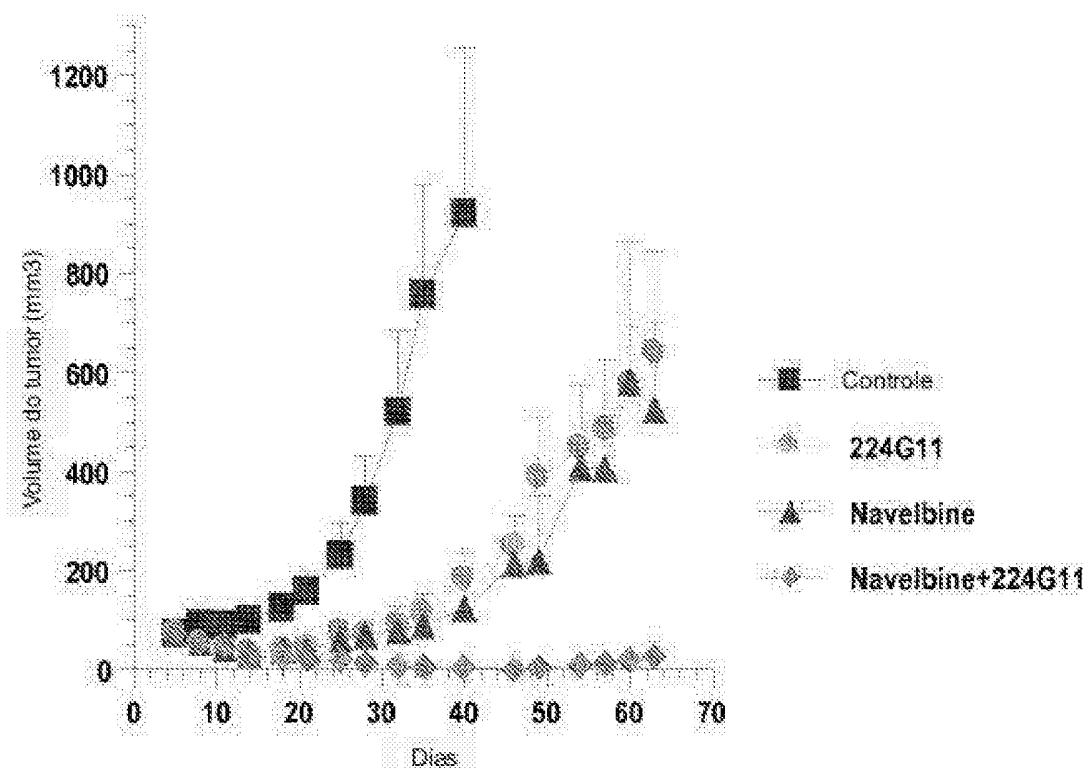
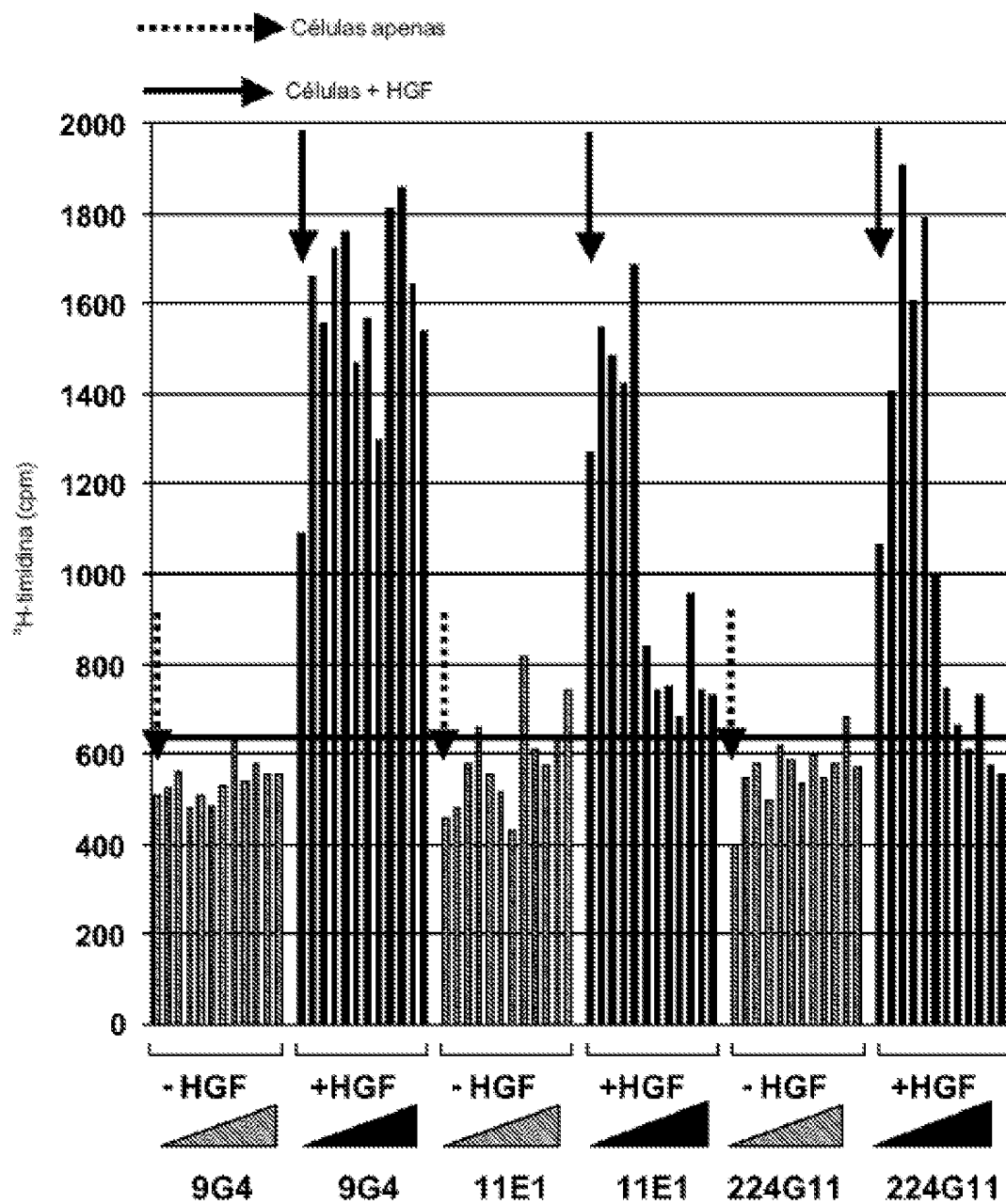


FIGURA 35

**FIGURA 36**

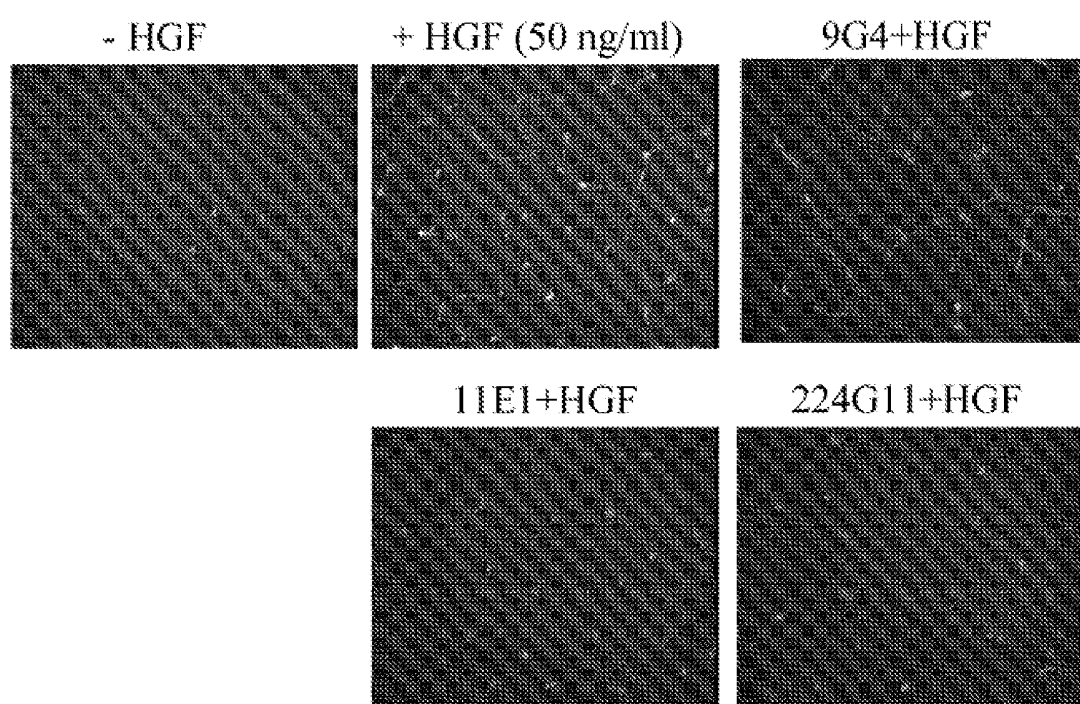


FIGURA 37

```

11E1 VL
AJ231214 HGKV4-79*01
----->
          20          25          30
G E K V T L T C S A S S S V S
ggg gag aag ggc acc tgg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt

11E1 VL
AJ231214 HGKV4-79*01
----->
CH21 - INGT          <----->
          33          40          45
S T Y          L Y W Y Q Q N
taa acc taa ... .. tgg taa tgg taa cag cag aag
S
--S-- ... ..

FR2 - INGT          <----->          CH22
          50          55          60
P G S S P K L W L Y T T S
cca gga taa taa cca aas ttc tgg att tat acc aca taa ... ..
S
... ..

- INGT          <----->
          60          65          70
I L A S S V P A N
... .. ttc cag gat tat gga gta cat ... gat aag
N
... ..

FR3 - INGT          <----->
          80          85          90
P S G S G          S S T S Y S L T
tuc agt ggc agt ggg ... .. tct ggg acc tct ttc tct ttc aca
... ..

----->
          95          100          105
I S K M E T E D A A A Y P C H
atc agc agc aag gag act gaa gat gat gcc tct tct ttc tgc cat
A
... ..

CH23 - INGT          <----->          FR4 - INGT
          110          115          120
Q W S G Y P P T P G S G T K L
cag tgg agt agt taa caa ttc aag ttc gga tgg ggg aca aag tgg
P
... .. gga G

----->
          123
D I K
gac ata aaa

```

FIGURA 38A

```

          CDR3 - IMGT          <----- FR4 - IMGT
          110          113          120
    Q  W  S  G  Y  P  P  T  P  G  A  G  T  K  L
1181 VL  cgg tgg agt agt tac cca ttc aag ttc ggc tgg ggg acc aag ttt
900777 IGKJ4*01          xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx xxx

          >
          123
    G  C  R
1181 VL  ggc atg aac
          E
900777 IGKJ4*01  --- --- --- c
```

FIGURA 38B

```

1181 VL
X72820 ICKV3D-7*01
<----- FX1 - IMGT -----
1 5 10 15
Q I V L T Q S P A I M S A S P
aaa att gut ctc acc cag tct cca gaa atc atg tct gaa tct cat
E M R L L
g-- ---a a-g--a --- ---c -c- c-- --- tlg ---a

----->
20 25 30
G S K V T L T C S A S S S Y S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gac agc taa agt gtc agt
R A S R Q
--- --a -ga -ca --- g-g t-- --a --g --- --t, cag --- --t --c

CUR1 - IMGT <-----
35 40 45
S T Y L Y W Y Q Q K
ccc acc taa ... .. ttg taa tgg taa cca cag acc
S
agt -g- --- --- --c --c --- ---a

FX2 - IMGT -----> CUR2
50 55 60
P Q S L T K L W Y Y T T S
cca gga taa taa cca aaa ctc tgg att taa acc aca taa ... ..
Q A R L C A
--t --g cag g-t --- --g --- ctc --c --- ggt g-- --- ... ..

- IMGT -----<-----
65 70 75
I G A S G Y P A R
... .. atc atg gat tct gaa gtc cat ... gtt acc
T R T I
... .. --c ag- --c a-- --c a-- --a ... --c a-g

FX3 - IMGT -----
80 85 90
P S Q S Q S S T S Y Q L Z
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct ggc acc tct taa tct ctc aca
S P T
--- --- --- --- ---a gac -t- a-- --- --c

----->
95 100 105
I S S M B T E G A A S Y P C S
atc acc agc atg gag act gaa gat gct gac tct tct ttc tgc cat
L Q P R V Y Q
--- --- --- --- ---a gac -t- a-- --- --c

CUR3 - IMGT -----<----- FX4 - IMGT -----
110 115 120
Q W S S Y E P T P S S G T K L
cag tgg agt agt taa cca ttc acc ttc ggc tgg ggc acc aag ttg
D Y N L
--- gat taa -aa -aa --t aa

----->
125
D I K
gac ata aaa
1181 VL

```

FIGURA 39A

```

CDR3 ~ IMGT ____ <----- FRA ~ IMGT ----->
110                115                120                123
Y   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L   D   I   K
11E1 VL          tac aca ttc acg ttc ggc tgg ggg aca aag tlg gac ata aaa
                        G                        V   E
AF103571 ZGR74*02      .....g ccc ccc ccc ccc gga ccc ccc ccc g--g--c--

```

FIGURA 39B

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)				FR2-IMGT (39-55)				CDR2-IMGT (56-65)			
	1	10	20		30				40	50			60			
11E1 VL	QIVLTQSPFAIMRASPGEKVTLTCSAG				SSVSTY.....				LYWYQQKPGSSPKLWIY				TTS.....			
Classificação	3	1	33	3	33	3	2		1		33	3	2			
FR humana	E--M-----TL-L---RA--S-P--								-S-----QA-R-L--							
11E1 HEVL	RIVLTQSPATLSLSPGERATLQCRAS				SSVSTY.....				LYWYQQRPGQAPRLIY				TTS.....			
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)				FR4-IMGT (114-123)							
	70	80	90	100	110				120							
11E1 VL	ILASGVP.ARFSGGQ..SGTSTSLTISGMETEDASSYFC				HQNSSYPFT				PGSGTKLDIK							
Classificação	22	3	3		213		331	2	3	3			3	32		
FR humana	TR-T-I-,-,-,-,-DFT-----LQP--P-V-Y-								--G---VE--							
11E1 HEVL	TRATGIF.ARFSGGQ..SGTSTSLTISGLQTEDFAVIYC				HQNSSYPFT				PGSGTIVEIK							

FIGURA 40

FIGURA 41A

1181 VH
L32068 IGHV4-1*01

CDR3 - IMGT

105110115

A I G G Y G S W F A Y

gca ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac

-g --- c

FIGURA 41B

1181 VH
V00770 IGHJ3*01

CDR3 - IMGT

110115120

I G G Y G G W F A Y W G Q G T

ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggt gaa gga aat

..

FR4 - IMGT

126

L G F V C A

atg gtc aat gtc tat gaa

--- --- --- --- g

FIGURA 41C

```

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

<----- FR1 - IMGT
1 15
G V G L G G S G A E L A E P
cag gtc cag att cag cag tct ggg gct ... gaa atg gca aaa cct
      V      V K
--- --g --- --g gc- --- --- --- ... --g g-- sag --g ---
      V      V K

----->
20 25 30
G A S Y E M S C K A S G Y E F
ggg gac tca gtg aag atg tca tgc aag gct tat ggc cac act ttt
      Y
--- --- --- --- --- ggc --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      V

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

CDR1 - IMGT
35 40 45
T S Y W M N W V K Q R
act tcc tcc tgg ... .. atg aac tgg gtg aac cag aag
      Y      R      A
--- c gg- --- -at- ... .. --- c- --- --- c- --- ggc
      Y ... .. H      R

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

FR2 - IMGT
50 55 60
P G Q G L E W I G Y I N P E T
ccu ggc cag gat atg gaa tgg atc ggc tcc att aac cct acc act
      M      W      N
--- --- --a --g --c --g --- --g --- --c --- --a --g-
      M      I      G G

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

- IMGT
65 70 75
G S E D Y N Q K L K D R
ggc tct act ... .. gac tcc aat cag aag tta aag ... gac aag
      G      N      A      F Q      G R
--- ggc --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      ... .. S      A      F Q ... G R

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

FR3 - IMGT
80 85 90
A T L T A D E S G N T A Y M Q
gac aca ttp act gca gac aac tcc tcc aac aca gcc tcc atg caa
V M R T I S H
-- --a --c --g --- --g --- at- --g --- --- --g --g-
V M R T T S V H

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

----->
95 100 105
L S S L T S E D S A V Y Y C A
ctg agc agc atg aca tct gag gac tct gca atc tat tac tgt gca
R K D T
--- --- --g --- --g --- --- --- a-g --c --g --- --- --- --g
      R      T

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

CDR3 - IMGT
110 115 120
I C G Y C S W P A Y W G Q G T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tcc tgg ggc caa ggg act
R
--g- --

11E1 VH
X52106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (Aminoácido)

----->
125
L V T V S A
cag gtc act gtc tct gca

```

FIGURA 42A

[illegible]

FIGURA 42B

	FR1-INGT (1-26)	CDR1-INGT (27-38)	FR2-INGT (39-55)	CDR2-INGT (56-63)
11E1 VH	QVQLQSGAELAKPGASVMSCKAS	GYTFTSYW...	MMWVQAPGQGLEWIGY	INPTFTST...
rank	3	33	1 3 3	2 1
Human FR	---V---VK---V---		---H---E-A---M-I	
11E1 H2VH	QVQLVQSGA.EVKRPGASVKVSCKAS	GYTFTSYW...	MMWVQAPGQGLEWIGY	INPTFTST...

	FR3-INGT (66-104)	CDR3-INGT (105-115)	FR4-INGT (116-126)
11E1 VH	DYNQKLR.EKATLTADKSNFTAVHQLSSLTSEDSAVYIC	AIGCYGSEWFAY	WGQGTLLVTVCA
Classificação	1 23 332 2 1 1 33 2 3 3 3		3
FR humans	S-A---PQ.GRV-M-R-T-TS-V-E---R---T---		---
11E1 H2VH	DYAQKPG.GRVTHADKSTSTVHQLSSLTSEDSAVYIC	AIGCYGSEWFAY	WGQGTLLVTVCA

FIGURA 43

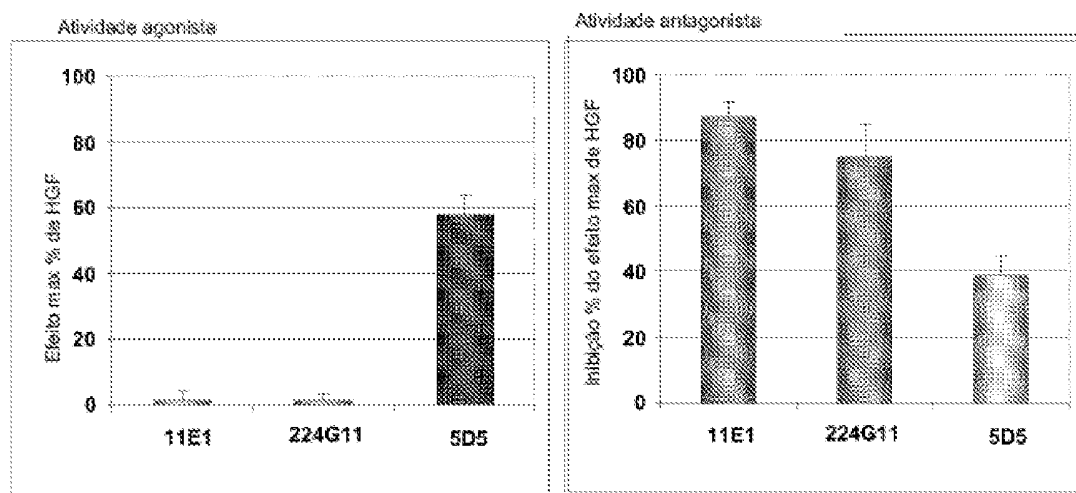


FIGURA 44A

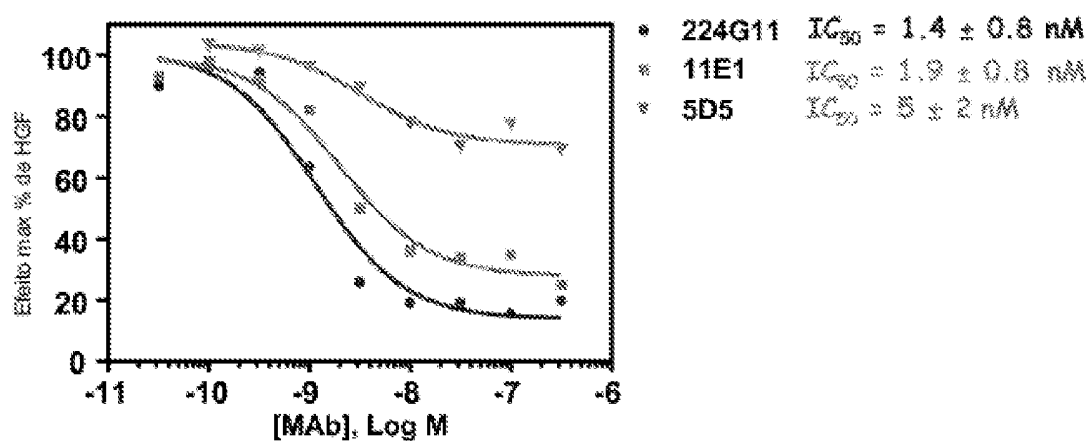


FIGURA 44B

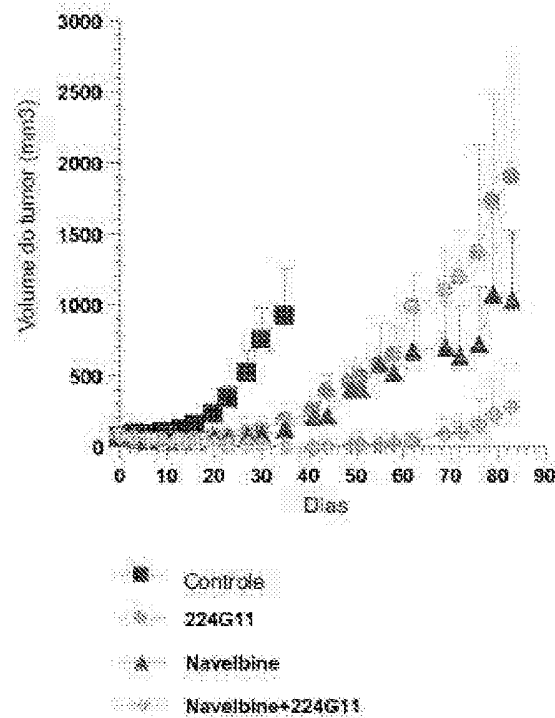


FIGURA 45

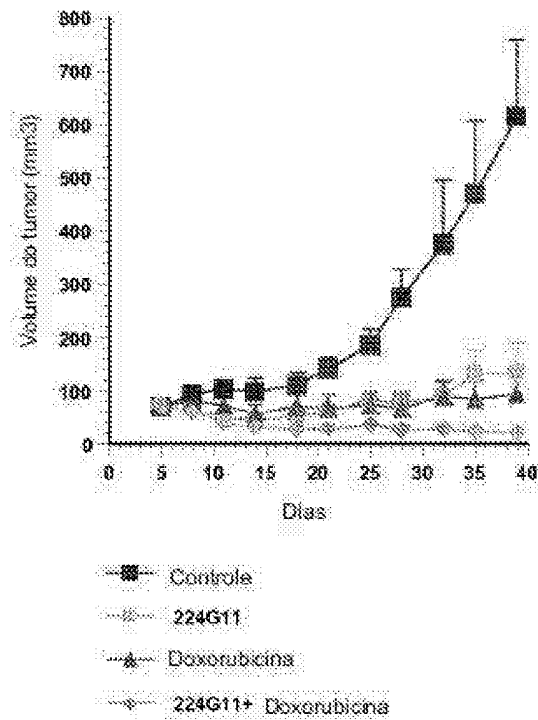


FIGURA 46

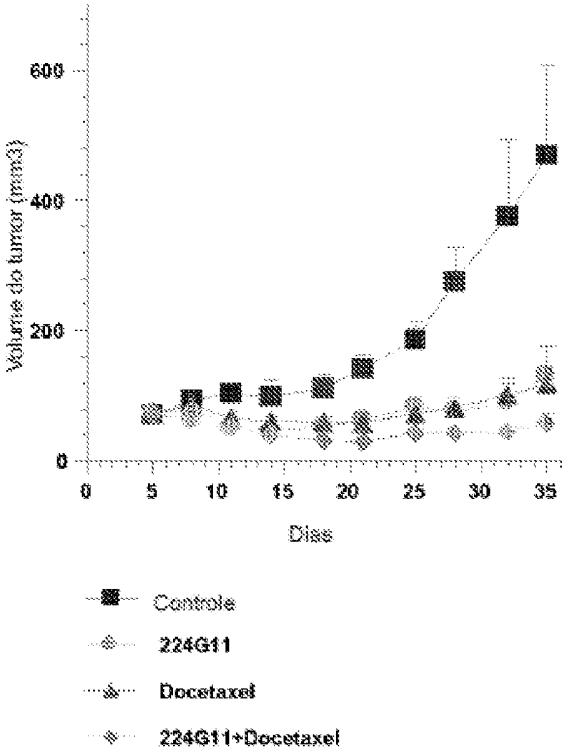


FIGURA 47

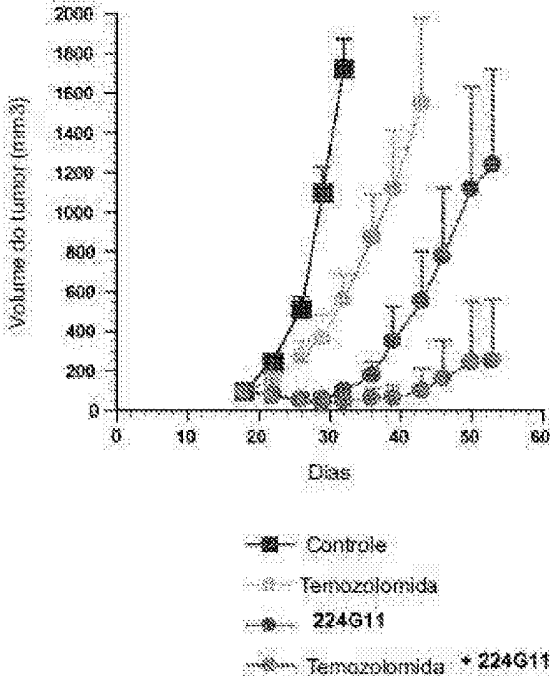


FIGURA 48

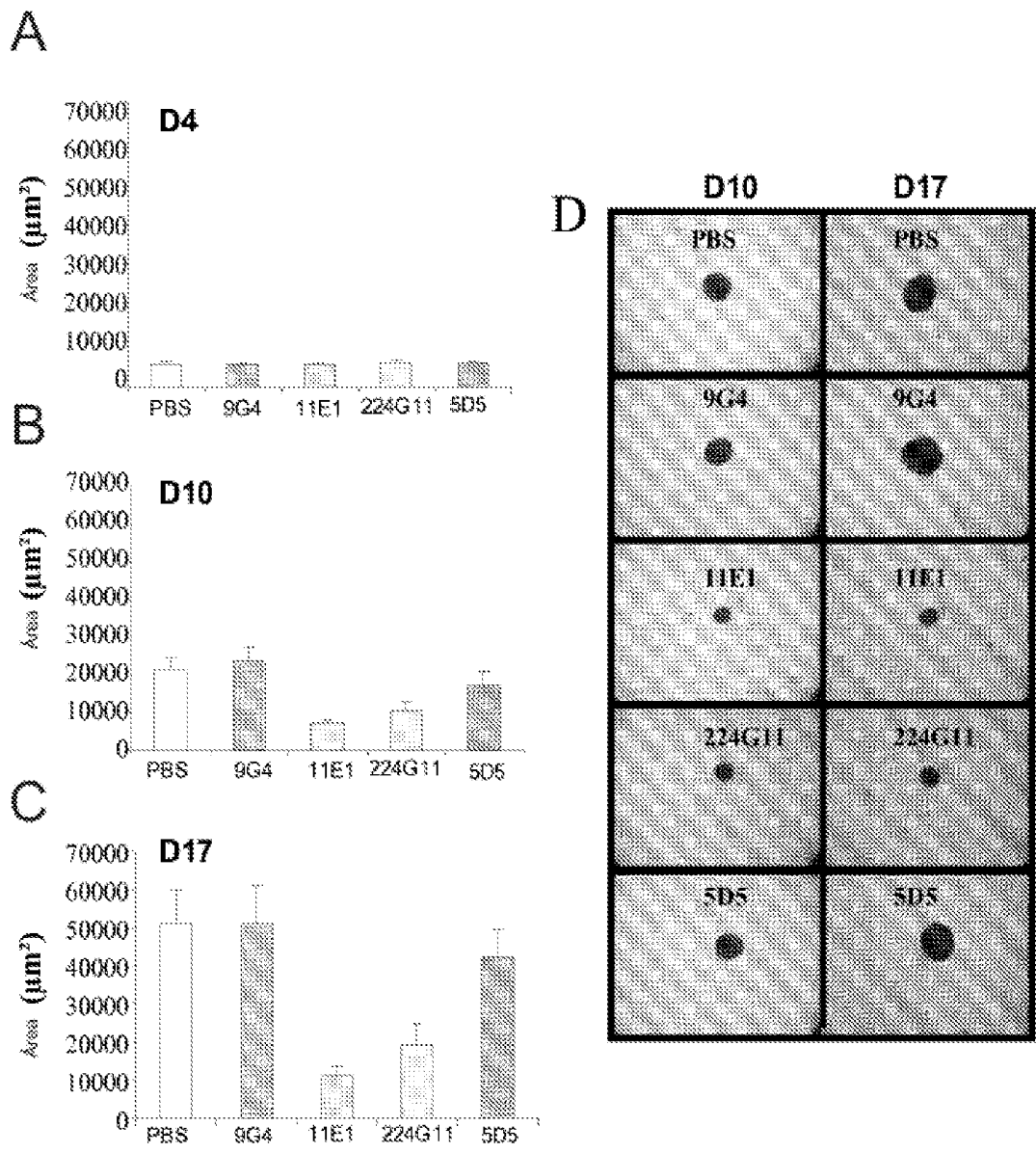


FIGURA 49A - FIGURA 49B - FIGURA 49C - FIGURA 49D

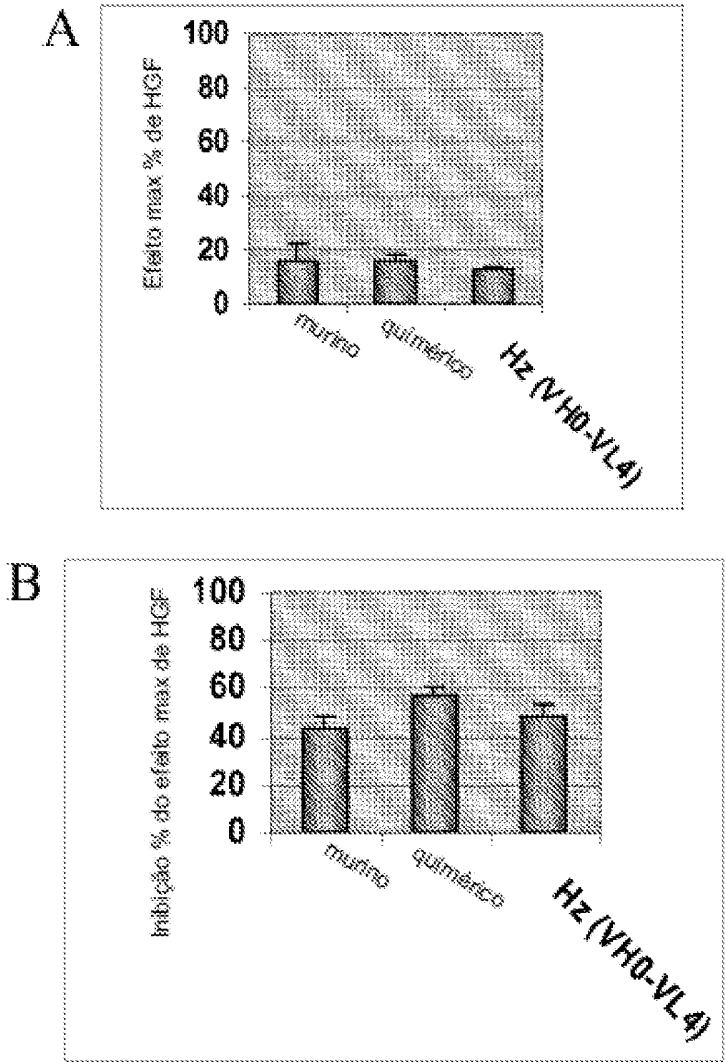


FIGURA 50A - FIGURA 50B

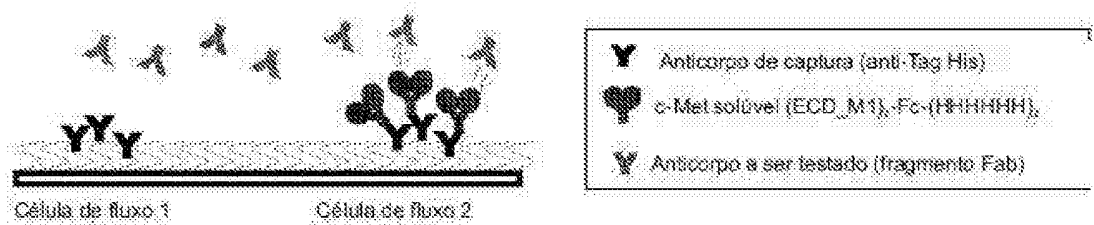


FIGURA 51

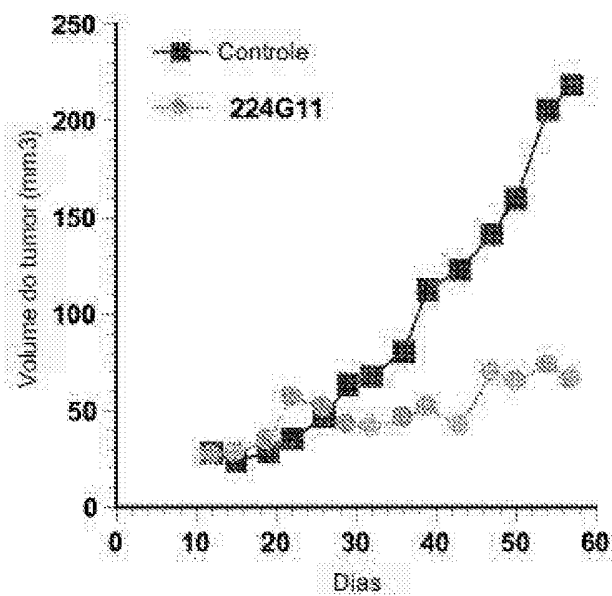


FIGURA 52

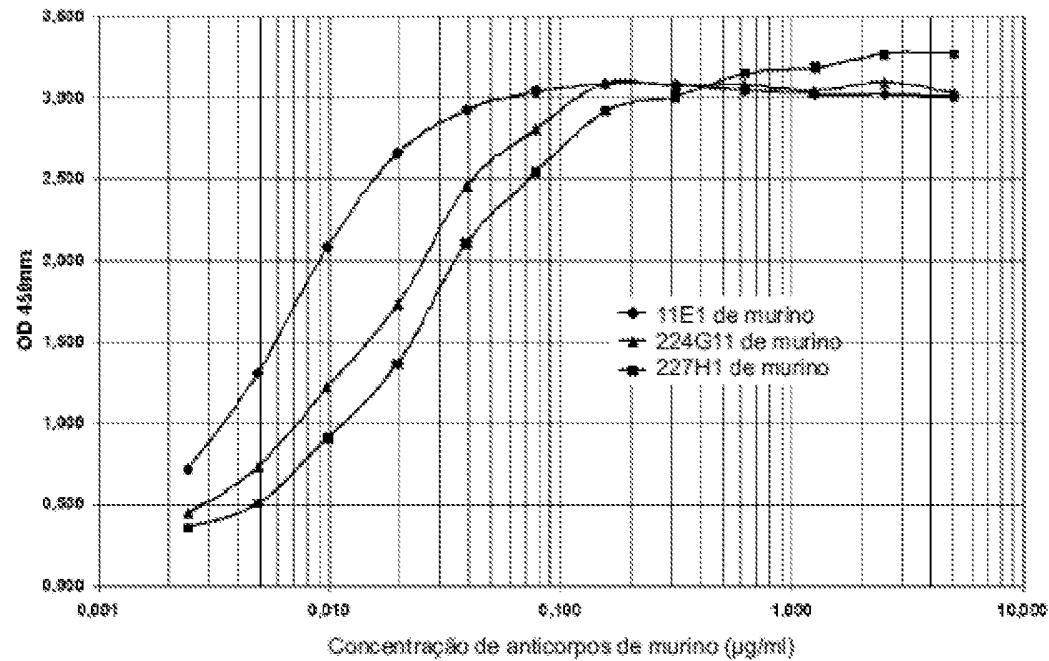


FIGURA 53

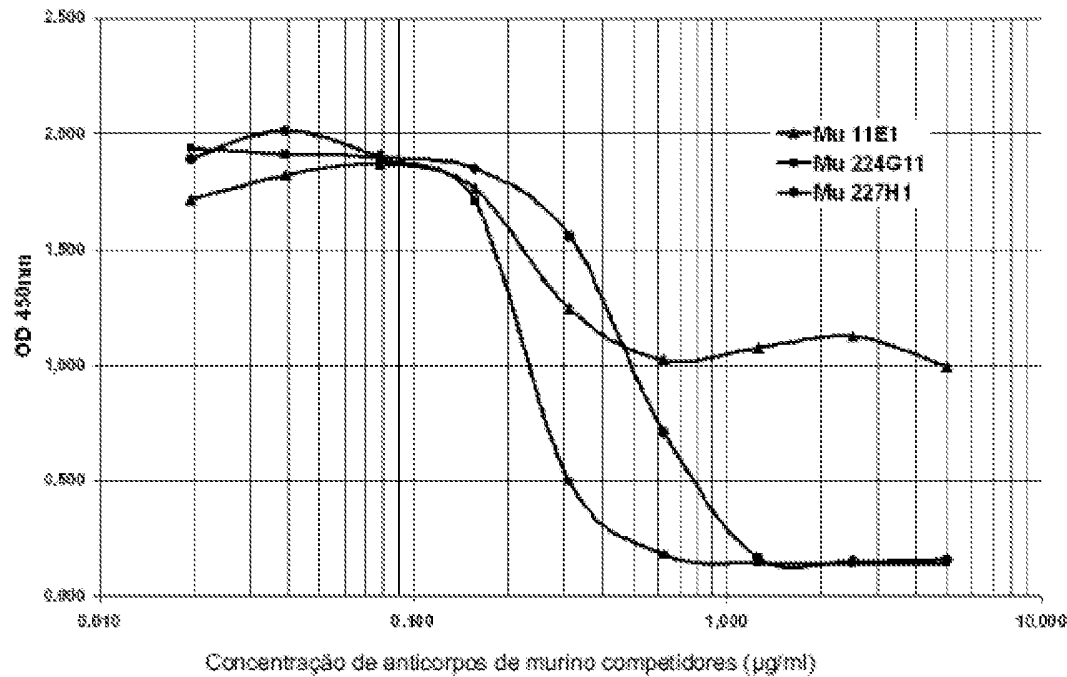


FIGURA 54

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
227H1 VH	EVQLQSSGGF,ELVKPGASMKISCRA	GYSTDTYT....	LHWVRQSHGKTELEWIGL	INPYNGGT..
FR humana	Q---V---A,-VK-----V-V-----		NR--R-AP-QG---M-W	
Trocado para	* * 2 *2 3 *		11 * 33 22 2 1	
227H1 H23VH	QVQLVQSGEP,EVVHPGASMKVSCFAS	GYSTDTYT....	LHWVRQSHGKTELEWIGL	INPYNGGT..
227H1 H23VH	QVQLVQSGEA,EVKHPGASVKVSCFAS	GYSTDTYT....	LHWVRQAPGKTELEWIGL	INPYNGGT..
227H1 H21VH	QVQLVQSGEA,EVKHPGASVKVSCFAS	GYSTDTYT....	LHWVRQAPGQGLEWNGL	INPYNGGT..

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-119)	FR4-IMGT (116-126)
	708090100	110	120
227H1 VH	TYNQKPK,GRATLTVEKSSSTAYMELLSITSEGSAYVYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS
FR humana	N-A---Q,-EV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----		-----LV-----
Trocado para	1 * 3 *2 2 1 1 3 ** 3 3 *		22
227H1 H23VH	TYAQRPK,GRATLTVEKSSSTAYMELSLPFSSTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS
227H1 H23VH	TYAQRPK,GRATLTVEKSSSTAYMELSLPFSSTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS
227H1 H21VH	TYAQRPK,GRATLTVEKSSSTAYMELSLPFSSTAVYYC	AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS

FIGURA 55

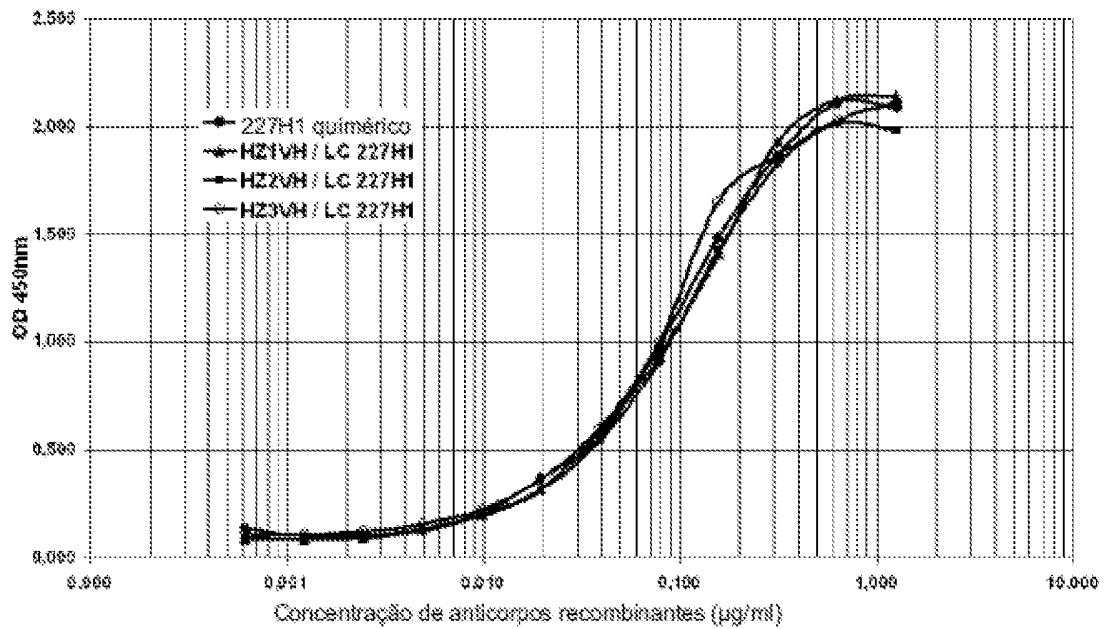


FIGURA 56

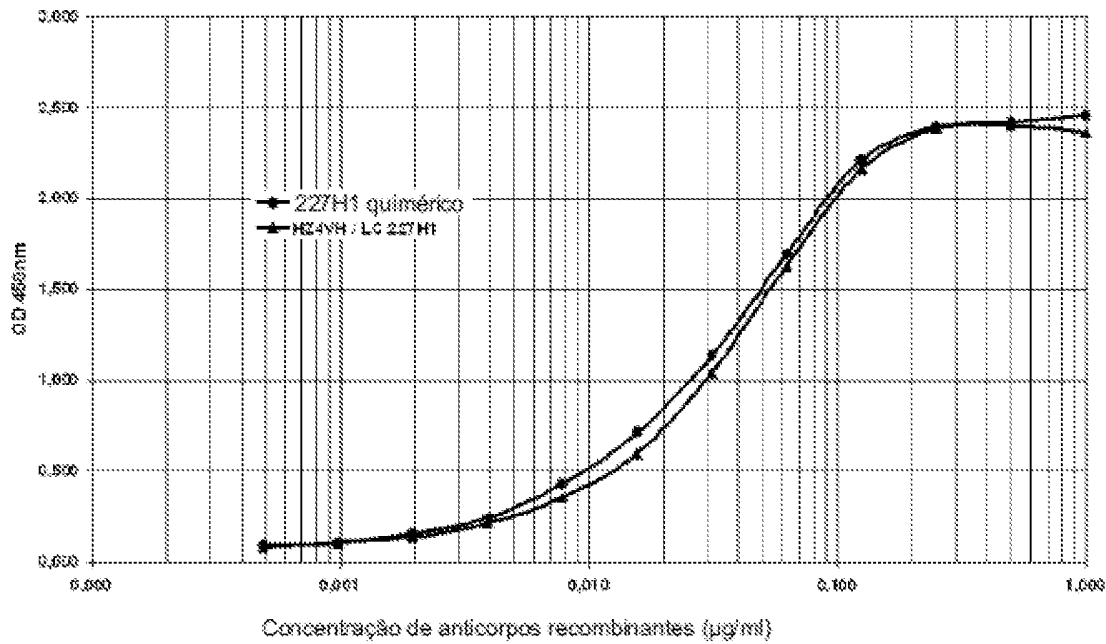


FIGURA 57

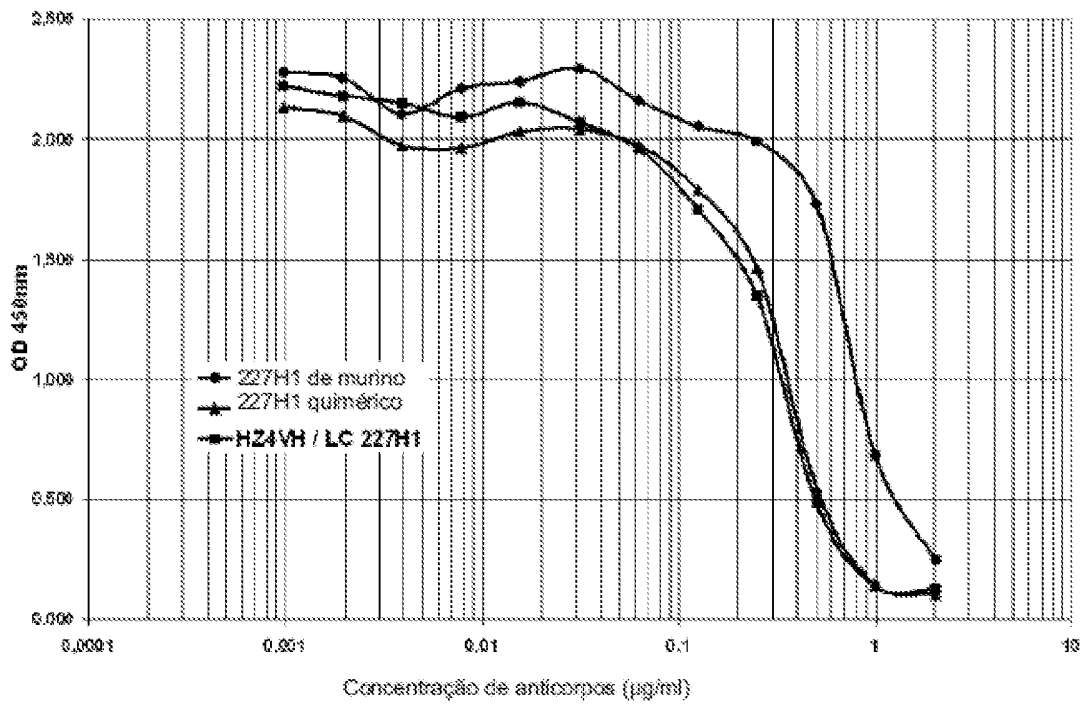


FIGURA 58

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
227H1-HZ VH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSKAS	GYSFTDYL...	MHWVRQAPGQGLEWMGN	INPTNGST..
Humanização	* * ! * ! *		\$ \$ * ! ! ! ! \$	

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)
	708090100	110	120
227H1-HZ VH	NYAQKPKQ.GRVTMTQTSISTAYMELSLRSDTAVYYC	AREBITKGFDF	WGQGTLLVTVES
Humanização	G * ! * ! ! S G !		!!

FIGURA 59

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
11E1 VH	QVQLVQSGA.ELAKPGASVVMSCNAS	GYTFTSYN...	MHWVRQAPGQGLEWIGY	INPTNGST..
FR humana	---	---	-R--R-A-----M-I	
Trocado para	* ** 3		1 * * 2 1	
11E1 HZ VH3	QVQLVQSGA.EVKKPGASVVMSCNAS	GYTFTSYN...	MHWVRQAPGQGLEWIGY	INPTNGST..
11E1 HZ VH2	QVQLVQSGA.EVKKPGASVVMSCNAS	GYTFTSYN...	MHWVRQAPGQGLEWIGY	INPTNGST..
11E1 HZ VH1	QVQLVQSGA.EVKKPGASVVMSCNAS	GYTFTSYN...	MHWVRQAPGQGLEWIGY	INPTNGST..

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)
	708090100	110	120
11E1 VH	DYNQELK.DRATLTAKKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGTLLVTVES
FR humana	S-A--FQ.GRV-M-R-T-TS-V--E---R---T-----		-----S
Trocado para	1 3 23 3 2 2 1 1 33 2 3 *		*
11E1 HZ VH3	DYNQELK.DRATLTAKKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGTLLVTVES
11E1 HZ VH2	DYAKKLQ.GRATLTAKKSTSTAYMELSLRSEDSAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGTLLVTVES
11E1 HZ VH1	DYAKKPKQ.GRVTMTAKKSTSTVMELSLRSEDSAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGTLLVTVES

FIGURA 60

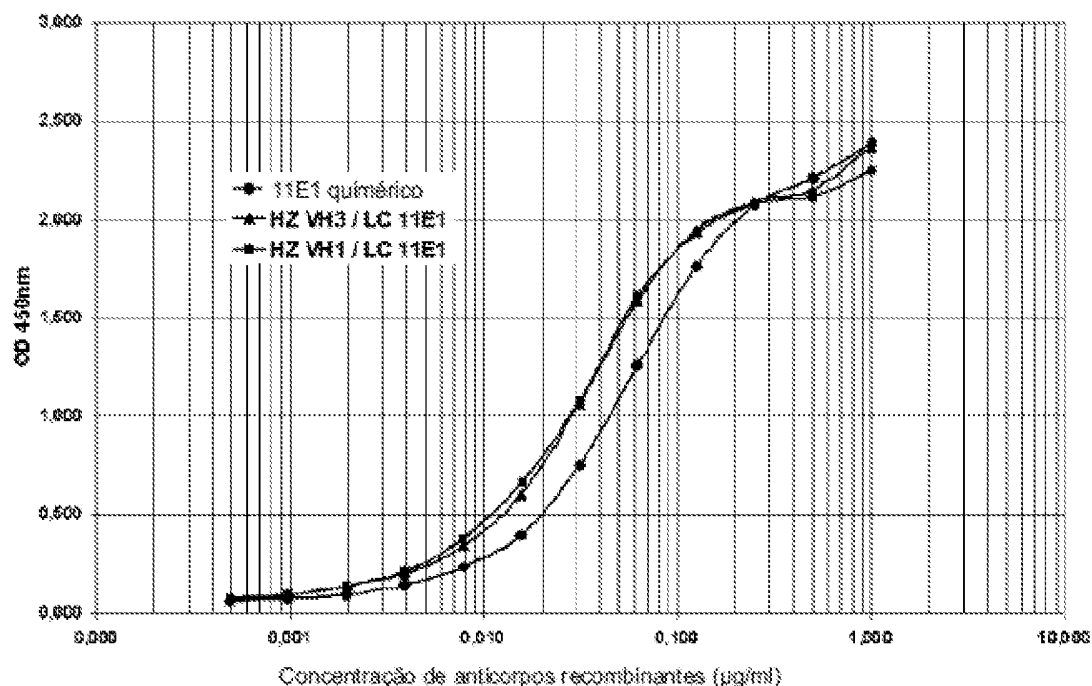


FIGURA 61

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20	30	40 50	60
11E1 VL
FR humans	QIVLTQSPAIIMCASPGEKVLTCAS	SSVSSTV....	LYWYQOKPFGSSPKLWIY	TTS.....
Trocado para	E~M-----TL~L-----PA---S~R--		-S-----QA~R~L--	
	* 1 *3 * ** * 2		1 33 * 2	
11E1 H2 VL3	EIVLTQSPATMISLSPGERATLSCAS	SSVSSTV....	LYWYQOKPFGSSPKLWIY	TTS.....
11E1 H2 VL2	EIVLTQSPATLRLSLSPGERATLSCAS	SSVSSTV....	LYWYQOKPFGQAPRLWIY	TTS.....
11E1 H2 VL1	EIVLTQSPATYLSLSPGERATLSCAS	SSVSSTV....	LYWYQOKPFGQAPRLIY	TTS.....
	FR3-IMGT (66-104)		CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	70 80 90 100		110	120
11E1 VL
FR humans	ILASGVFARFSGSG..SGTSYSLTISMETEDAAASYFC		HQWSSYPFT	FGSGTKLDIK
Trocado para	TR~T~I~.....,-----DFT-----LQP---F~V~Y~			---G---VE---
	22 * * 213 321 2 3 3			3 *2
11E1 H2 VL3	ILATGIPARFSGSG..SGTSYSLTISMETEDAAASYFC		HQWSSYPFT	FGSGTKVDIK
11E1 H2 VL2	ILATGIPARFSGSG..SGTSYSLTISMETEDAAVYFC		HQWSSYPFT	FGGSKTVDIK
11E1 H2 VL1	TRATGIPARFSGSG..SGTDYTLTISLQTEDFAVYFC		HQWSSYPFT	FGGSKTVELI

FIGURA 62

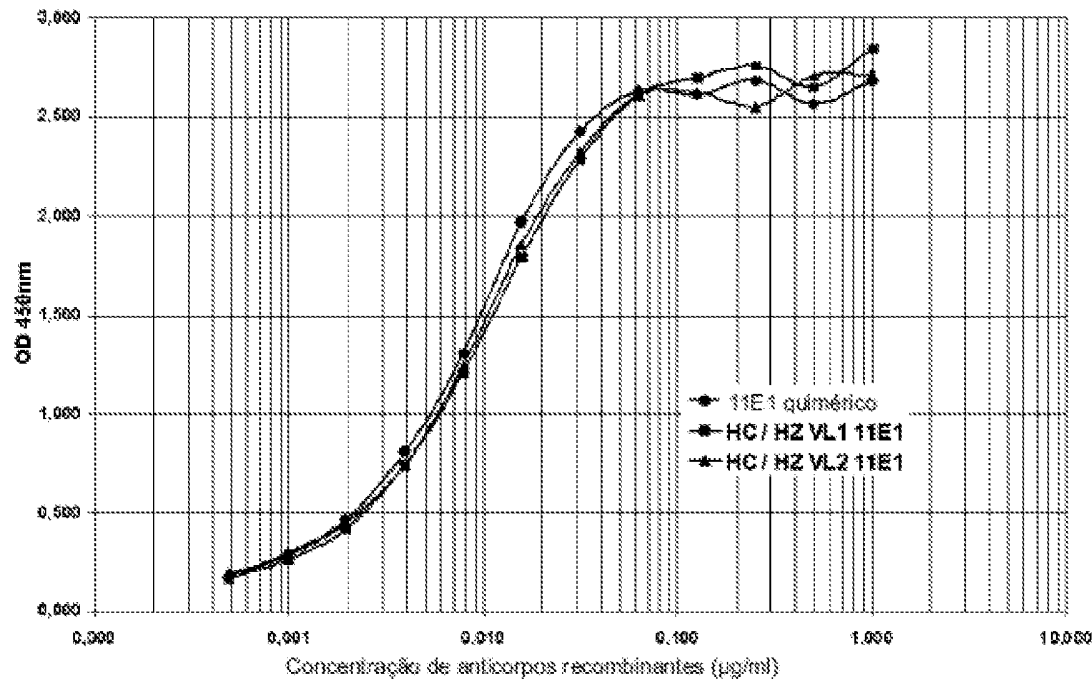


FIGURA 63

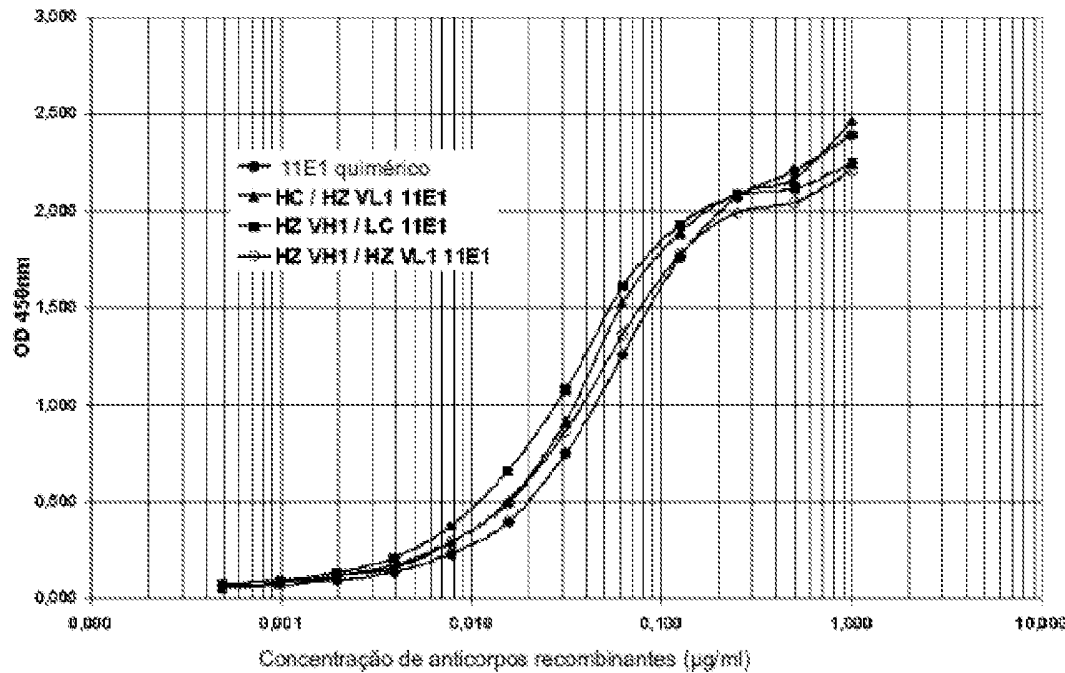


FIGURA 64

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
224G11 VH	EVQLQQSGP	ELVKPGASVKISCT	TS	GYIFTAYT	MHWVRQSLGSELDWIG	IKPNNGLA	..	
227H1 VH	EVQLQQSGP	ELVKPGASVKISCT	TS	GYFTDYT	LHWVRQSHGKLEWIG	INPYNGGT	..	
FR humana	Q	---	V	---	A	---	VK	---	---
224G11 H2 VH0	QVQLVQSGA	EVKKPGASVTVCK	AS	GYIFTAYT	MHWVRQAPCQGLEWIG	IKPNNGLA	..	
	FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)			
	70	80	90	100	110	120			
224G11 VH	NYNQRFK	GRATLFVDESSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC			ARSEITTEFDY	RGQGEALTFS			
227H1 VH	TYNQRFK	GRATLFVDESSSTAYMELSLTSEDSAVYYC			AREEITKDFDE	RGQGTTLTFS			
FR humana	---	A	---	Q	---	EV	M	P	---
224G11 H2 VH0	NYAQRFK	GRATLFVDESSSTAYMELSLTSEDSAVYYC			ARSEITTEFDY	RGQGEALTFS			

FIGURA 65

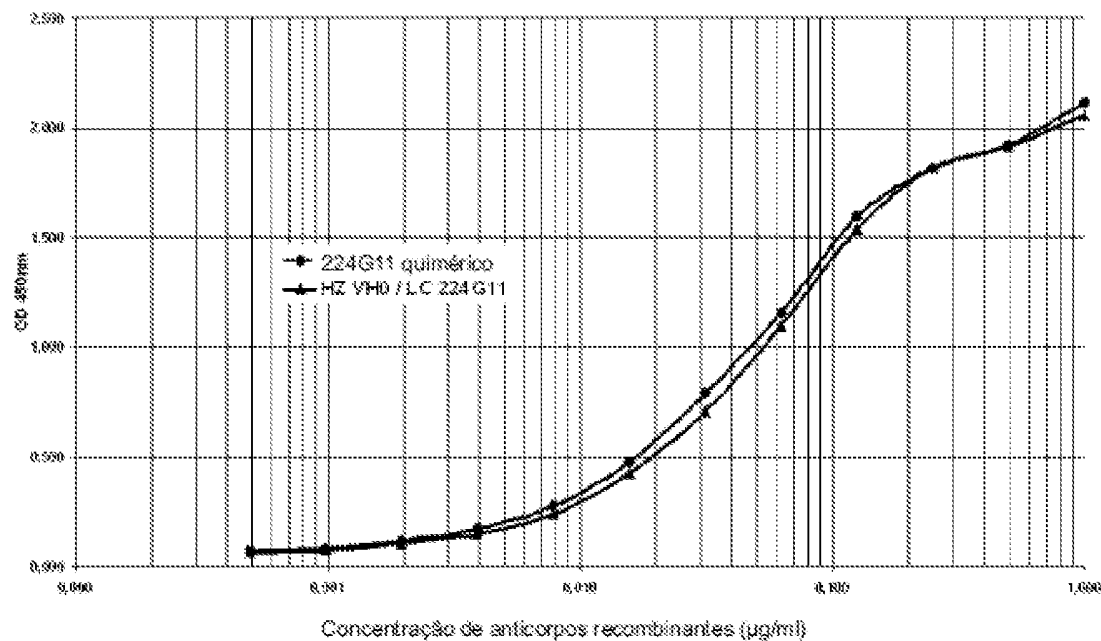


FIGURA 66

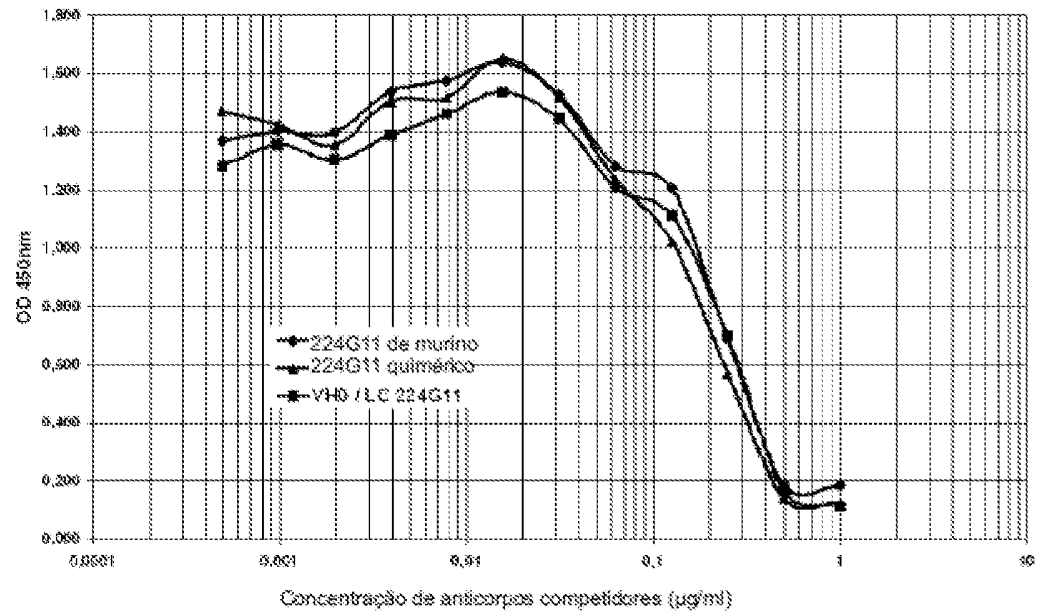


FIGURA 67

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
224G11 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS ESDSYANSE.. MHNYQKPKPGPPKLLIY PAS.....											
Shorter Hu-FR	E-----T-SL-P-E---L-----LA-----A-R-----											
Rank	* * 3* 2 3 *											
224G11 HZ VL3	EIVLTQSPATLALSLGQRATISCRAS ESDSYANSE.. MHNYQKPKPGPPKLLIY PAS.....											
Longer Hu-FR	---N---D-----E---H-KE---LA-----											
Rank	1 * 3 * 32											
224G11 HZ VL6	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS ESDSYANSE.. MHNYQKPKPGPPKLLIY PAS.....											
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)				FR4-IMGT (114-123)			
	70	80	90	100	110	120						
224G11 VL	NLESGIP.ARFSGSG..SRDFTLTINPVEADGVATYYC QQSKEDPLT FGSGTKLRMK											
Hu-FR mais curta classificação	-PAT---,---G-----SSL-PE-P-V---G---V-I-											
	22* 1 32* 3 2 3 3 *											
224G11 HZ VL3	NLESGIP.ARFSGSG..SRDFTLTINPVEADGVATYYC QQSKEDPLT FGSGTKLRMK											
Hu-FR mais longa	TR---V---D-----SSLQ-E---V---G---V-I-											
	22 * * 1 32* 3 3 3 *											
224G11 HZ VL6	NLESGIP.ARFSGSG..SRDFTLTINPVEADGVATYYC QQSKEDPLT FGSGTKLRMK											

FIGURA 68

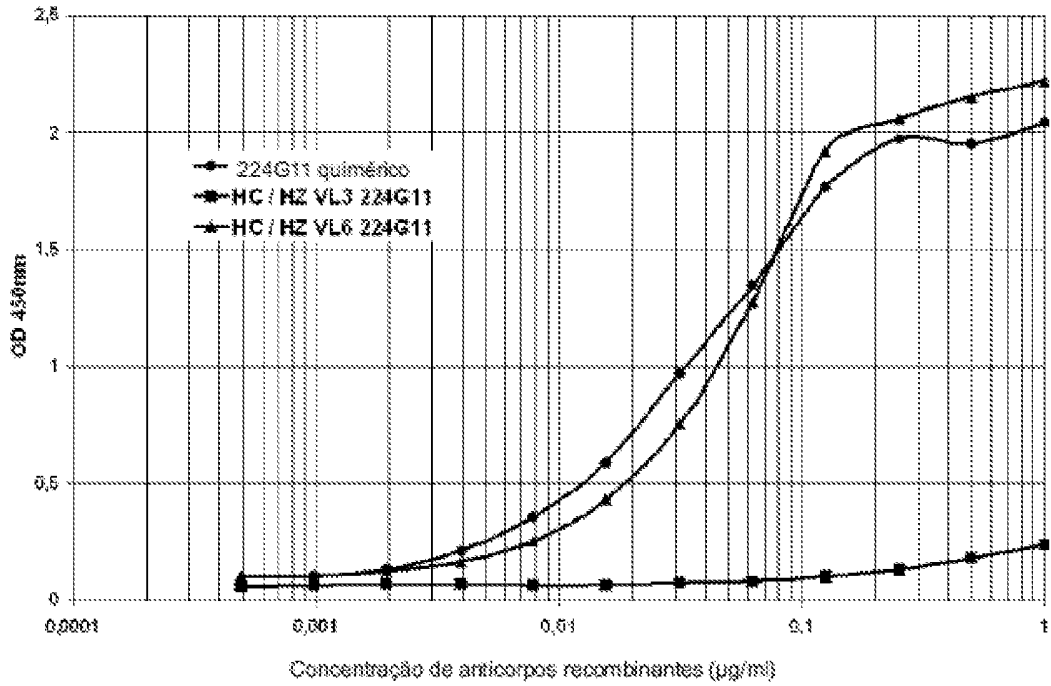


FIGURA 69

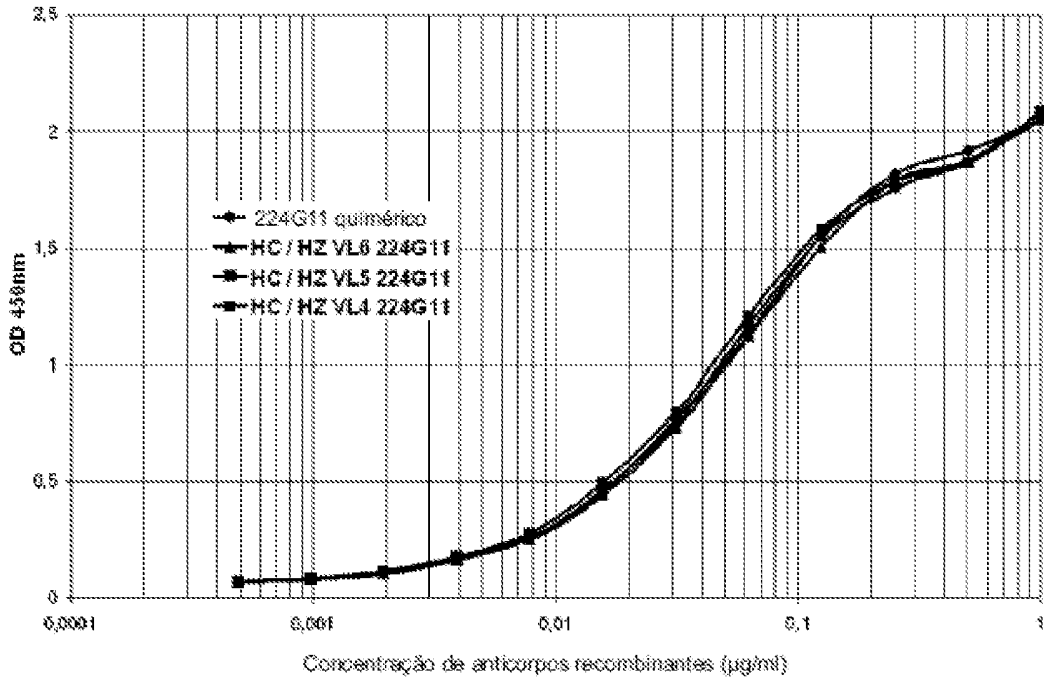


FIGURA 70

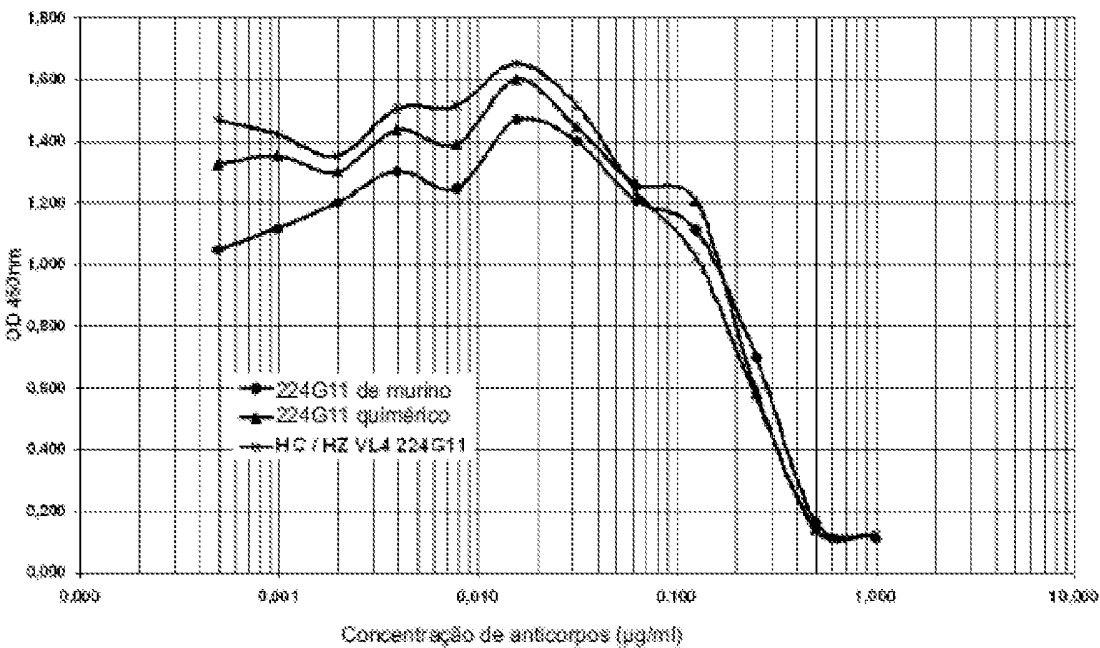


FIGURA 71

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20		30		40	50		60
224G11 H2 VL4									

FIGURA 72

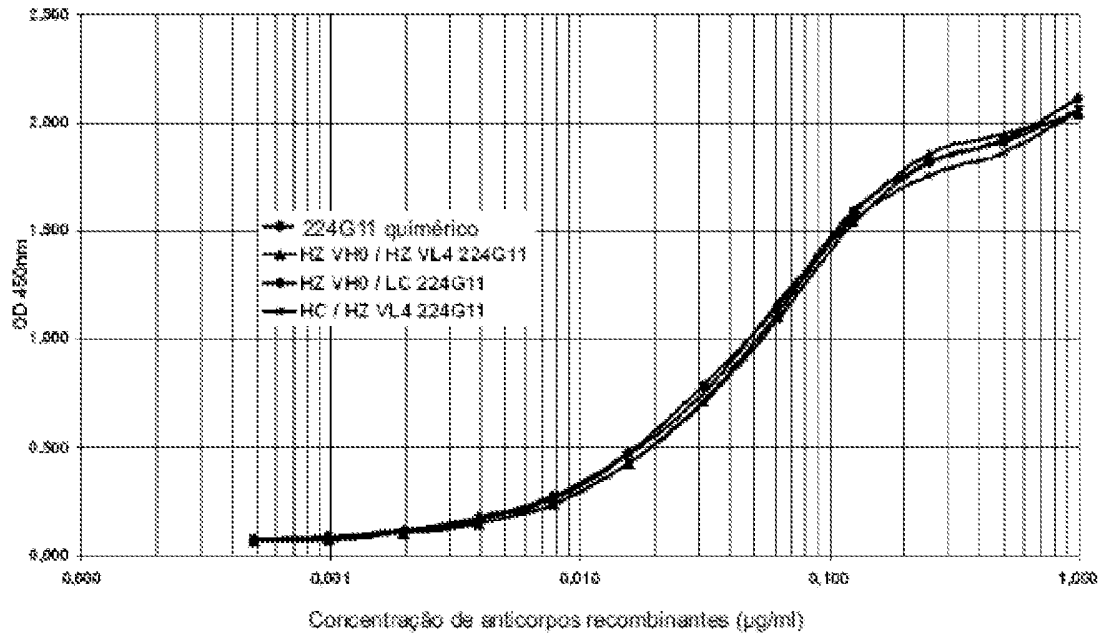


FIGURA 73

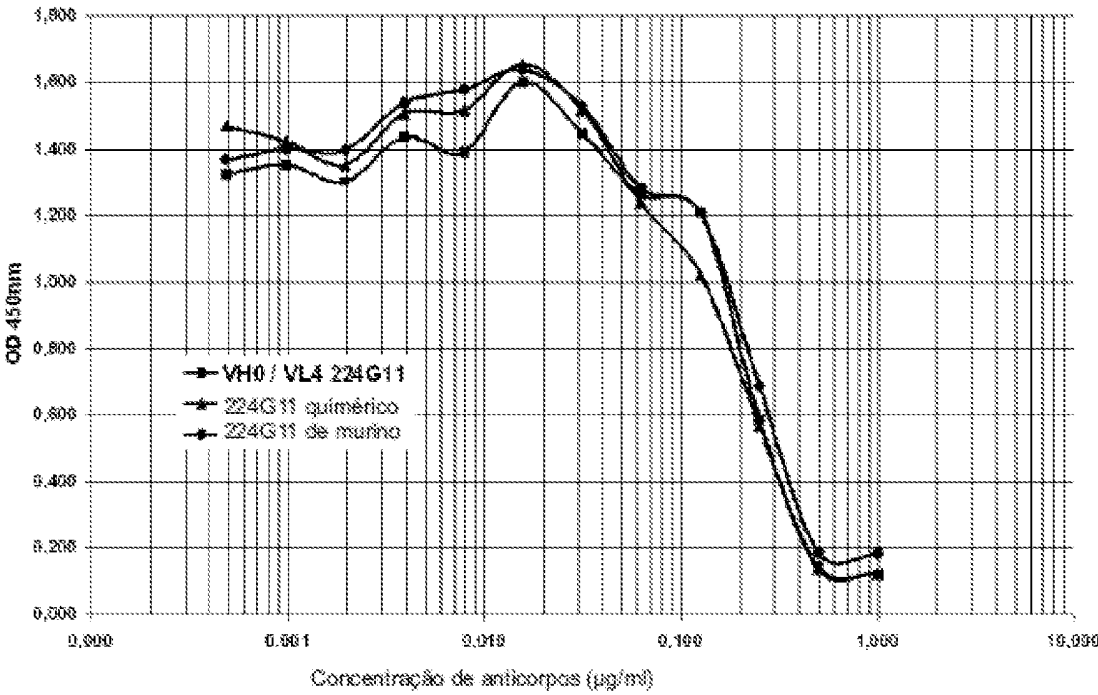


FIGURA 74

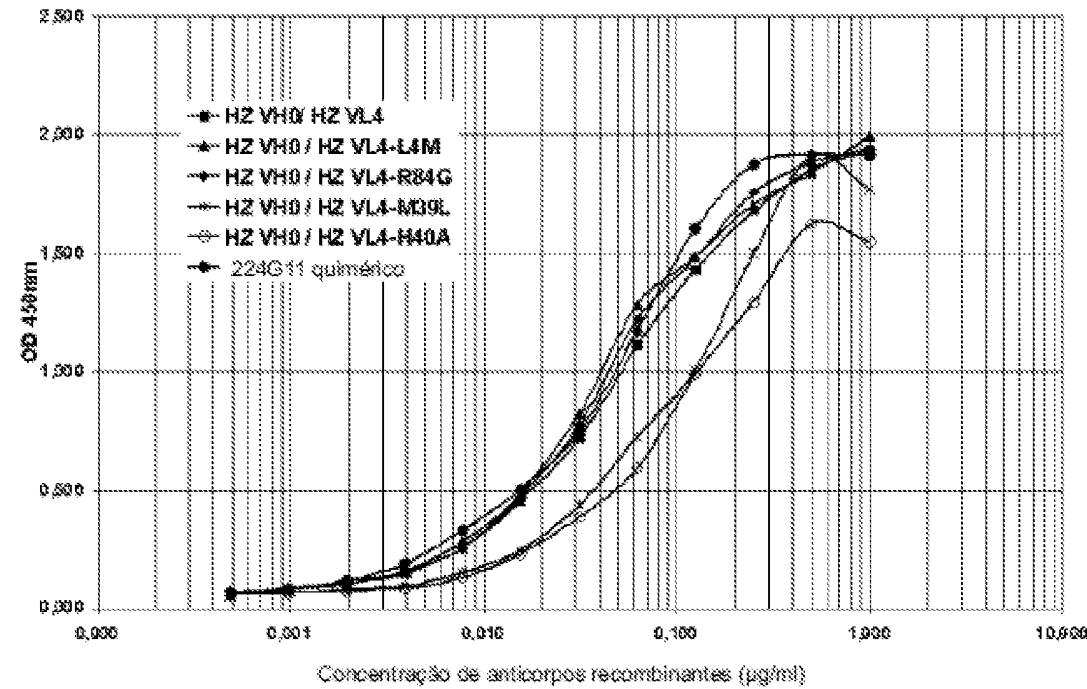


FIGURA 75

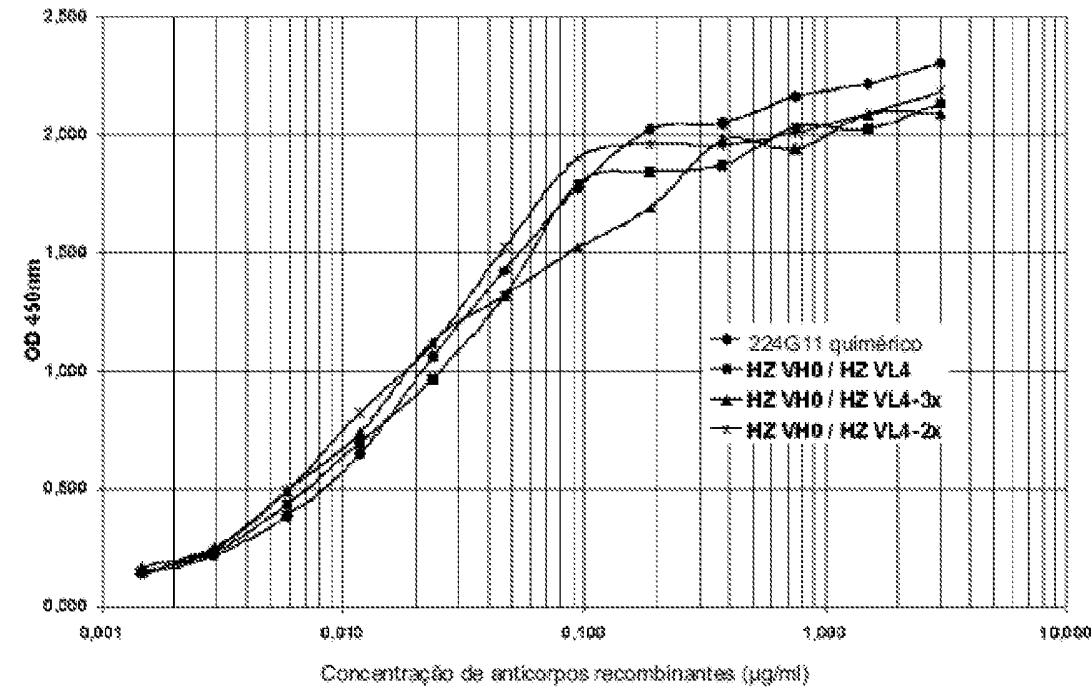


FIGURA 76

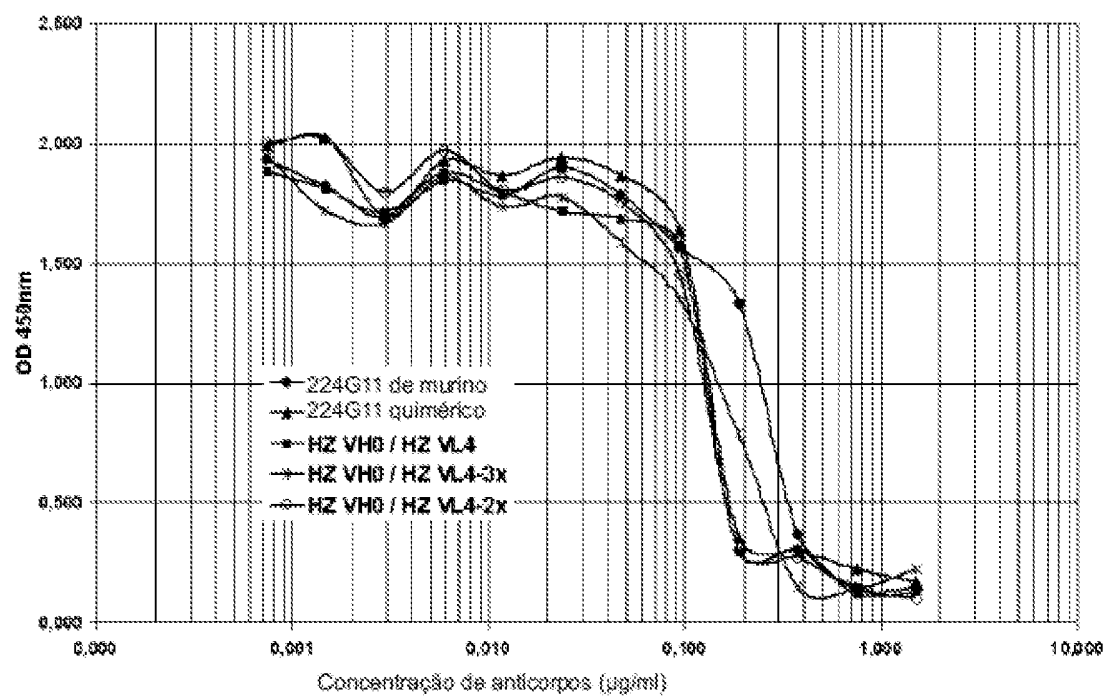


FIGURA 77

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * WO 9838557 A
- * WO 2006015371 A
- * WO 2005016382 A
- * US 4318567 A
- * EP 0451261 A
- * EP 0662040 A
- * EP 09127 A
- * EP 0586647 A
- * US 5530101 A
- * US 6180370 B
- * US 5595099 A
- * US 5893761 A
- * US 5639641 A
- * US 6054297 A
- * US 5886152 A
- * US 5877293 A
- * US 4831175 A
- * US 4424200 A, Crockford
- * US 4479930 A, Hnatowich
- * EP 07301231 A
- * US 60929789 B
- * US 61020639 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * D.P. BOTTARO et al. *Science*, 1991, vol. 251, 802-804
- * L. NALDINI et al. *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, 1991, vol. 10, 2867-2878
- * M.F. DI RENZO et al. *Oncogene*, 1991, vol. 6, 1997-2003
- * E. SONNENBERG et al. *J. Cell. Biol.*, 1993, vol. 123, 223-235
- * F. BALDT et al. *Nature*, 1995, vol. 376, 768-771
- * C. SCHMIDT et al. *Nature*, 1995, vol. 373, 699-702
- * TSARFATY et al. *Science*, 1994, vol. 263, 98-101
- * NAGAYAMA T; NAGAYAMA M; KOHARA S; KAMIGUCHI H; SHIBUYA M; KATOH Y; ITOH J; SHINOHARA Y. *Brain Res.*, 2004, vol. 5 (2), 155-66
- * TAHARA Y; IDO A; YAMAMOTO S; MIYATA Y; UTO H; HORI T; HAYASHI K; TSUBOUCHI H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, vol. 307 (1), 146-51
- * BIRCHMEIER et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, vol. 4, 915-925
- * L. TRUSOLINO; COMOGLIO P. M. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2 (4), 289-300
- * J.G. CHRISTENSEN; BURROWS J.; SALGIA R. *Cancer Letters*, 2005, vol. 226, 1-26
- * HAYS JL; WATOWICH SJ. *Biochemistry*, 17 August 2004, vol. 43, 10570-8
- * GAO CF; VANDE WOUDE GF. *Cell Res.*, 2005, vol. 15 (1), 49-51
- * FURGE KA; ZHANG YW; VANDE WOUDE GF. *Oncogene*, 2000, vol. 19 (49), 5582-9
- * GU H; NEEL BG. *Trends Cell Biol.*, March 2003, vol. 13 (3), 122-30
- * FAN S; MA YX; WANG JA; YUAN RQ; MENG Q; CAO Y; LATERRA JJ; GOLDBERG ID; ROSEN EM. *Oncogene*, 27 April 2003, vol. 19 (18), 2212-23
- * TRUSOLINO L; BERTOTTI A; COMOGLIO PM. *Cell*, 2001, vol. 107, 643-54
- * VANDERVOORT R; TAHERTE; WIELENGA VJ; SPAARGAREN M; PREVOR; SMIT L; DAVID G; HARTMANN G; GHERARDI E; PALS ST. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274 (10), 6499-508
- * GIORDANO S; CORSO S; CONROTTO P; ARTIGIANI S; GILESTRO G; BARBERIS D; TAMAGNONE L; COMOGLIO PM. *Nat. Cell Biol.*, 2002, vol. 4 (9), 726-4
- * CONROTTO P; VALDEMBRI D; CORSO S; SERINI G; TAMAGNONE L; COMOGLIO PM; BUSSOLINO F; GIORDANO S. *Blood*, 2005, vol. 105 (11), 4321-9
- * CONROTTO P; CORSO S; GAMBERINI S; COMOGLIO PM; GIORDANO S. *Oncogene*, 2004, vol. 23, 5131-7
- * ENGELMAN JA. *Science*, 2007, vol. 316, 1039-43
- * CAO B; SU Y; OSKARSSON M; ZHAO P; KORT EJ; FISHER RJ; WANG LM; VANDE WOUDE GF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98 (13), 7443-8
- * MARTENST; SCHMIDT NO; ECKERICH C; FILL-BRANDT R; MERCHANT M; SCHWALL R; WESTPHAL M; LAMSZUS K. *Clin. Cancer Res.*, 2008, vol. 12 (20), 6144-52

- * KUBA K ; MATSUMOTO K ; DATE K ; SHIMURA H ; TANAKA M ; NAKAMURA T. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 6737-43
- * CHRISTENSEN JG ; SCHRECK R ; BURROWS J ; KURUGANTIP ; CHANE L P ; CHEN J ; WANG X ; RUSLIM L ; BLAKE R. *Cancer Res.*, 2003, vol. 63, 7345-55
- * MARTENS T. et al. *Clin. Cancer Res.*, 2006, vol. 12 (20), 6144-6152
- * KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497
- * ANGERS et al. *PNAS*, 2000, vol. 97, 3684-89 [0020]
- * LEFRANC M.-P. *Immunology Today*, 1997, vol. 18, 509
- * LEFRANC M.-P. *The Immunologist*, 1999, vol. 7, 132-136
- * LEFRANC M.-P. ; POMMIE C. ; RUIZ M. ; GIUDICELLI V. ; FOULQUIER E. ; TRUONG L. ; THOUVENIN-CONTET V. ; LEFRANC. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, vol. 27, 55-77
- * RUIZ M. ; LEFRANC M.-P. *Immunogenetics*, 2002, vol. 53, 857-863
- * KAAS Q. ; LEFRANC M.-P. *Current Bioinformatics*, 2007, vol. 2, 21-30
- * KAAS Q. ; RUIZ M. ; LEFRANC M.-P. T cell receptor and MHC structural data. *Nucl. Acids. Res.*, 2004, vol. 32, D208-D210
- * SMITH ; WATERMAN. *Ad. App. Math.*, 1981, vol. 2, 482
- * NEDDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443
- * PEARSON ; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444
- * TATUSOVA et al. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 174, 247-250
- * HARLOW ; LANE. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726
- * VERHOEYEN et al. *BioEssays*, 1988, vol. 8, 74
- * MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 82, 6851-6855
- * JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- * VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536
- * RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- * SINGER et al. *J. Immun.*, 1992, vol. 150, 2844-2857
- * MOUNTAIN et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1992, vol. 10, 1-142
- * BEBBINGTON et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 168-175
- * SKERRA A. *J. Mol. Recogn.*, 2000, vol. 13, 187-187
- * SKERRA A. *J. Biotechnol.*, 2001, vol. 74 (4), 257-75
- * KOHL et al. *PNAS*, 2003, vol. 100 (4), 1700-1705
- * BES et al. *BBRC*, 2006, vol. 343, 334-344
- * BES et al. *FEBS letters*, 2001, vol. 506, 67-74
- * SAMBROOK et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, 1989
- * STEWARD et al. *Solid phase peptide synthesis*. Pierce Chem. Company, 1964
- * traité de chimie thérapeutique, vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers. Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique, 2003
- * HUNTER W.M. ; GREENWOOD F.C. *Nature*, 1962, vol. 194, 495
- * Antibodies. HARLOW ; LANE. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726
- * ANGERS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, 3684-3689
- * AAPRO et al. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.*, 2001, vol. 40, 251-263
- * CURRAN et al. *Drugs Aging*, 2002, vol. 19, 695-697 [0347]
- * KRAUS-BERTHIER et al. *Clin.Cancer Res.*, 2000, vol. 6, 297-304
- * ZOU H. T. et al. *Cancer Res.*, 2007, vol. 67, 4438-4447
- * NAKAMURA Y. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, vol. 215, 483-488
- * BUSSOLINO F. et al. *J. Cell Biol.*, 1992, vol. 119, 629-641
- * ROSEN E.M. et al. *Supplementum to Experientia*, 1991, vol. 59, 76-88