

(11) Número de Publicação: **PT 2059536 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/28 (2013.01) **C12N 15/13** (2013.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.08.14**

(30) Prioridade(s): **2006.08.14 US 822362 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.05.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.01.08**
073/2014

(73) Titular(es):

XENCOR, INC.

111 W. LEMON AVENUE MONROVIA, CA 91016
US

(72) Inventor(es):

MATTHEW J. BERNETT

US

SEUNG YUP CHU

US

JOHN R. DESJARLAIS

US

SHER BAHADUR KARKI

US

GREGORY ALAN LAZAR

US

(74) Mandatário:

NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO

PT

RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD19**

(57) Resumo:

A PRESENTE DIVULGAÇÃO DESCREVE ANTICORPOS QUE VISAM CD19, EM QUE OS ANTICORPOS COMPREENDEM PELO MENOS UMA MODIFICAÇÃO EM RELAÇÃO A UM ANTICORPO PARENTE, EM QUE A MODIFICAÇÃO ALTERA A AFINIDADE PARA UM FCGR OU ALTERA A FUNÇÃO EFETORA EM COMPARAÇÃO COM O ANTICORPO PARENTE. SÃO TAMBÉM DIVULGADOS MÉTODOS PARA USO DOS REFERIDOS ANTICORPOS.

RESUMO

"ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD19"

A presente divulgação descreve anticorpos que visam CD19, em que os anticorpos compreendem pelo menos uma modificação em relação a um anticorpo parente, em que a modificação altera a afinidade para um FcγR ou altera a função efetora em comparação com o anticorpo parente. São também divulgados métodos para uso dos referidos anticorpos.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS OTIMIZADOS QUE VISAM CD19"

ANTECEDENTES

Células B

As células B são linfócitos que desempenham um papel importante na resposta imune humoral. São produzidas na medula óssea da maioria dos mamíferos, e representam 5-15% do conjunto de circulação linfoide. A principal função das células B é produzir anticorpos contra vários抗énios, e são um componente essencial do sistema imune adaptativo.

O corpo humano produz milhões de tipos diferentes de células B por dia que circulam no sangue e linfa desempenhando um papel de vigilância imunológica. As células B, também referidas como linfócitos B, não produzem anticorpos até que se tornem plenamente ativadas. Cada célula B tem uma única proteína recetora (referida como a recetora das células B (RCB)) na sua superfície que se irá ligar a um抗énio específico. A RCB é uma imunoglobulina ligada a membrana, e é esta molécula que permite a distinção das células B dos outros tipos de linfócitos, assim como é o principal recetor envolvido na ativação das células B. Um vez que as células B encontram o seu抗énio cognato e recebem um sinal adicional da célula T auxiliar, podem diferenciar-se ainda mais nos vários tipos de células B listados a seguir. As células B podem tornar-se ou um desses tipos de células diretamente ou podem sofrer um passo de diferenciação intermédio, a reação do centro germinativo, em que as células B irão hípermutar a

região variável do seu gene de imunoglobulina e possivelmente sofrer uma mudança de classe.

O desenvolvimento das células B ocorre através de várias fases, cada fase representando uma mudança no conteúdo genómico nos loci de anticorpos. As fases de desenvolvimento das células B incluem células B Progenitoras, Pró-células B Precoces, Pro-células B Tardias, Pré-células B Grande, Pré-células B Pequenas, células B Imaturas, e células B Maduras.

As células B maduras podem ser divididas em quatro tipos principais:

As células B-1 expressam CD5, um marcador usualmente encontrado nas células T. As células B-1 também expressam IgM em quantidades maiores que IgG. Segregam anticorpos polireativos naturais de baixa afinidade encontrados no soro e frequentemente têm especificidades direcionadas para os próprios抗原s, e polissacáridos bacterianos comuns. As células B-1 estão presentes em baixo número nos nódulos linfáticos e no baço e, em vez disso, são encontrados predominantemente nas cavidades peritoneais e pleurais.

As células B-2 são as células B convencionais às quais muitos textos se referem. Residem na medula óssea, baço, e nódulos linfáticos. São de curta duração e quando desencadeadas por抗原s podem diferenciarse em células B de memória produtoras de IgG. No decurso destas respostas de anticorpo a IgG pode sofrer uma substancial maturação de afinidade.

As células B plasmáticas (também conhecidas como células plasmáticas) são células B grandes que foram expostas a抗igénio e produzem e segregam grandes quantidades de anticorpos, que auxiliam na destruição de micróbios ao ligarem e facilitarem o direcionamento pelos fagócitos, assim como a ativação do sistema de complemento. As células plasmáticas são por vezes referidas como fábricas de anticorpos.

As células B de memória são formadas a partir de células B ativadas que são específicas para o抗igénio encontrado durante a resposta imune primária. Estas células vivem durante muito tempo, e podem responder rapidamente a seguir a uma segunda exposição ao mesmo抗igénio.

Quando as células B falham em qualquer passo do processo de maturação, estas morrerão através de um mecanismo chamado de apoptose. Se reconhecem o seu próprio抗igénio durante o processo de maturação, as células B ficarão suprimidas (conhecido como anergia) ou sofrem apoptose. As células B são produzidas continuamente na medula óssea, mas somente uma pequena porção de células B recentemente formadas sobrevive para participar no conjunto de células B periféricas de vida longa.

Nos anos recentes, surgiram dados sugerindo que os linfócitos B desempenham um papel mais vasto nas respostas imunes e não são meramente os receptores passivos de sinais que resultam em diferenciação das células plasmáticas produtoras de anticorpo. Juntamente com os seus papéis tradicionais como células que apresentam抗igénios e precursoras de células plasmáticas produtoras de anticorpo, foi também observado que as células B mostraram regular também as funções das células que apresentam抗igénio (CAAs) e das célula T, produzir citocinas, e expressar

pares recetor/ligando que previamente se tinha pensado serem limitados a outros tipos de células.

Distúrbios das células B

Devido ao seu papel crítico na regulação do sistema imune, a desregulação das células B está associada a uma diversidade de distúrbios. Os distúrbios das células B, também aqui referidos como doenças relacionadas com as células B, dividem-se em proliferação excessiva ou descontrolada (linfomas, leucemias), e defeitos de desenvolvimento das células B/produção de imunoglobulina (imunodeficiências). A maioria (80%) dos casos de linfoma tem origem nas células B. Estes incluem linfoma não-Hodgkin (LNH), leucemia linfooblástica aguda (LLA), e doenças autoimunes relacionadas.

O LNH é uma malignidade heterogénea com origem nos linfócitos. Nos Estados Unidos (U.S.), a incidência é estimada em 65.000/ano com mortalidade de aproximadamente 20.000 (American Cancer Society, 2006; e SEER Cancer Statistics Review). A doença pode ocorrer em todas as idades, o surgimento habitual começa em adultos acima dos 40 anos, com a incidência a aumentar com a idade. O LNH é caracterizado por uma proliferação clonal de linfócitos que se acumulam nos nódulos linfáticos, sangue, medula óssea e baço, embora qualquer órgão importante possa estar envolvido.

O diagnóstico e caracterização histológica do LNH são feitos usando uma combinação de critérios morfológicos e de imunofenotipos. O sistema de classificação corrente usado pelos patologistas e clínicos é a Classificação de Tumores da Organização Mundial de Saúde (OMS), o qual organiza o LNH em célula B precursora e madura ou neoplasias das

células T. O PDQ correntemente divide o LNH em indolente ou agressivo para entrada em ensaios clínicos. Para consistência do presente documento será também usada uma divisão similar. O grupo de LNH indolente é composto primariamente por subtipos foliculares, linfoma linfocítico de pequenas células, MALT, e zona marginal; o indolente engloba aproximadamente 50% de doentes de LNH de célula B diagnosticados de novo. O LNH agressivo inclui doentes com diagnóstico histológico de células B grandes primariamente difusas (40% de todos os doentes diagnosticados de novo têm células grandes difusas), de Burkitt, e células do manto.

O percurso clínico do LNH é altamente variável. Um dos determinantes principais é o subtipo histológico. Os tipos de LNH mais indolentes são considerados como sendo doença uma incurável. Os doentes respondem inicialmente quer à quimioterapia quer à terapia por anticorpo mas a maioria irá recidivar. Os estudos até à data não demonstraram uma melhoria na sobrevivência com a intervenção precoce. Em doentes assintomáticos, é aceitável "observar e esperar" até que o doente se torne sintomático ou até o ritmo doença parecer estar a acelerar. Ao longo do tempo, a doença pode transformar-se numa histologia mais agressiva. A média de sobrevivência é 8 até 10 anos, e os doentes indolentes frequentemente recebem 3 ou mais tratamentos durante a fase de tratamento da sua doença. O tratamento inicial de um doente de LNH indolente sintomático historicamente tem sido a combinação de quimioterapia. Os agentes mais comumente usados incluem: ciclofosfamida, vincristina e prednisona (CVP); ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona (CHOP); ou o análogo da purina, fludarabina. Aproximadamente 70% a 80% dos doentes irá responder à sua quimioterapia inicial, e duração das últimas remissões na ordem de 2-3 anos. Em última análise, a maioria dos doentes recidiva. A descoberta e o uso clínico do anticorpo anti-

CD20, rituximab, proporcionaram melhorias significativas na resposta e na taxa de sobrevida. O padrão de tratamento atual para a maioria dos doentes é rituximab + CHOP (R-CHOP) ou rituximab + CVP (R-CVP). O interferão está aprovado para tratamento inicial do LNH em combinação com agentes de alquilação, mas tem uso limitado nos U.S.

A terapia com rituximab tem mostrado ser eficaz em vários tipos de LNH, e está atualmente aprovada como um tratamento de primeira linha tanto para LNH indolente (linfoma folicular) como agressivo (linfoma das células B grande difuso). Porém, há limitações significativas do anticorpo monoclonal anti-CD20 (mAb), incluindo resistência primária (50% de resposta em doentes indolentes com recidiva), resistência adquirida (50% de taxa de resposta após retratamento), resposta completa rara (2% de taxa de resposta completa em população com recidiva), e um padrão continuado de recidiva. Finalmente, muitas células B não expressam CD20, e assim muitas doenças das células B não são tratáveis usando a terapia de anticorpo anti-CD20. Anticorpos contra抗énios, outros para além do CD20, podem ter efeitos antilinfoma que podem ultrapassar a resistência anti-CD20 ou aumentar a atividade da terapia anti-CD20.

Para além do LNH existem vários tipos de leucemias que resultam da desregulação das células B. A leucemia linfocítica crónica (também conhecida como "leucemia linfoide crónica" ou "LLC"), é um tipo de leucemia de adulto causada por uma acumulação anormal de linfócitos B. Em LLC, os linfócitos malignos podem parecer normais e maduros, mas não são capazes de lidar de forma eficaz com a infecção. A LLC é a forma mais comum de leucemia em adultos. Os homens são duas vezes mais propensos a desenvolver LLC que as mulheres. No entanto, o fator de risco chave é a

idade. Mais de 75% dos novos casos são diagnosticados em doentes com idade acima dos 50. Mais de 10.000 casos são diagnosticados todos os anos e a mortalidade é praticamente 5.000 por ano (American Cancer Society, 2006; e SEER Cancer Statistics Review).

A LLC é uma doença incurável mas que progride lentamente na maioria dos casos. Muitas pessoas com LLC levam uma vida normal e ativa durante muitos anos. Devido ao seu início lento, as fases iniciais de LLC não são geralmente tratados uma vez que se acredita que a intervenção precoce de LLC não aumenta o tempo de sobrevida ou a qualidade de vida. Em vez disso, a condição é monitorizada ao longo do tempo. Os tratamentos iniciais de LLC variam dependendo no diagnóstico exato e da progressão da doença. Existem dezenas de agentes usados para a terapia de LLC. Embora o análogo da purina fludarabina mostra dar taxas de resposta superiores ao clorambucilo como terapia primária, não há evidência que o uso precoce da fludarabina aumenta a sobrevida global. A combinação dos regimes de quimioterapia tais como fludarabina com ciclofosfamida, FCR (fludarabina, ciclofosfamida e rituximab) e CHOP são eficazes tanto em novos diagnosticados ou em LLC recidivados. O transplante da medula óssea alogénica (células estaminais) é raramente usado como um tratamento de primeira linha para LLC devido ao seu risco.

A LLC "refratária" é uma doença que já não responde favoravelmente ao tratamento. Neste caso são consideradas as terapias mais agressivas, incluindo o transplante de medula óssea (células estaminais). O anticorpo monoclonal alemtuzumab, direcionado contra CD52, pode ser usado em doentes com doença refratária baseada na medula óssea.

Um outro tipo de leucemia é a leucemia linfooblástica aguda (LLA), também conhecida como leucemia linfocítica aguda. A LLA é caracterizada pela sobreprodução e multiplicação contínua de glóbulos brancos imaturos e malignos (também conhecidos como linfoblastos) na medula óssea. 'Aguda' refere-se a estado imaturo, indiferenciado, de linfócitos em circulação ("blastos"), e em que a doença progride rapidamente com expectativa de vida de semanas a meses, se não tratada. A LLA é a mais comum na infância com um pico de incidência aos 4-5 anos de idade. As crianças de 12-16 anos de idade morrem mais facilmente desta do que as outras. Atualmente, pelo menos 80% de crianças com LLA são consideradas curáveis. Menos de 4.000 casos são diagnosticados todos os anos e a mortalidade é quase 1.500 por ano (American Cancer Society, 2006; e SEER Cancer Statistics Review).

A autoimunidade resulta de uma rutura da autotolerância envolvendo mecanismos imunes humorais e/ou mediados por célula. Entre as consequências da falha na tolerância central e/ou periférica, são a sobrevivência e a ativação das células B e células T auto reativas. Exemplos de doenças autoimunes incluem, por exemplo, artrite reumatóide (RA), sistema de lúpus eritematoso (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI). A patogénesis da maioria das doenças autoimunes está ligada à produção de autoanticorpos contra抗énios próprios, conduzindo a uma diversidade de patologias associadas. Os autoanticorpos são produzidos por células plasmáticas terminalmente diferenciadas que são derivadas de células B naïves ou de memória. Além disso, as células B podem ter outros efeitos na patologia autoimune, como células apresentando抗énio (CAAs) que pode interagir com e estimular as células T auxiliares, estimulando adicionalmente o ciclo da resposta

imune anti-própria. A depleção das células B pode ter impacto direto na produção de autoanticorpos. De facto, o tratamento da RA e SLE com as terapias de deplexão das células B tais como Rituxan foi demonstrado ter benefício clínico para as duas classes de doença (Edwards & Cambridge, Nat. Rev. Immunol. 2006; Dass et al., Future Rheumatol. 2006; Martin & Chan, Annu. Rev. Immunol. 2006).

Infelizmente, não se sabe *a priori* quais os mecanismos de ação que podem ser ótimos para um dado抗igénio alvo. Além disso, não são conhecidos quais os anticorpos que podem ser capazes de mediar um dado mecanismo de ação contra uma célula alvo. Em alguns casos uma falta de atividade de anticorpo, tanto mediado por Fv como mediado por Fc, pode ser devido ao direcionamento de um epitopo no抗igénio alvo que é fraco para mediar essa atividade. Noutros casos, o epitopo alvo pode ser propício a uma desejada atividade mediada por Fv ou mediada por Fc, mas a afinidade (afinidade da região Fv para抗igénio ou afinidade da região Fc para os receptores Fc) pode ser insuficiente. No sentido de resolver este problema, a presente invenção descreve modificações para anticorpos anti-CD19 que forneça atividades otimizadas mediadas por Fv e Fc. Uma vasta gama de aplicações destes anticorpos otimizados é contemplada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção particularmente relaciona-se com um anticorpo que se liga a CD19, e que compreende uma cadeia pesada CDR1, uma cadeia pesada CDR2, e uma cadeia pesada CDR3 descritas na SEQ ID NO: 40 e uma cadeia leve CDR1, uma cadeia leve CDR2, e uma cadeia leve CDR3 descritas na SEQ ID NO: 58, em que a numeração é de acordo com Kabat.

Num aspeto, a presente divulgação é direcionada para um anticorpo que se liga a CD19, em que o anticorpo comprehende pelo menos uma modificação na região constante em relação ao anticorpo parente, e em que o anticorpo da divulgação se liga com afinidade alterada a um recetor Fc ou altera a função efetora em comparação com o anticorpo parente.

Num aspeto, a divulgação é direcionada para o anticorpo que se liga a CD19, incluindo pelo menos uma modificação na região constante em relação a um anticorpo anti-CD19 parente, em que o anticorpo se liga com afinidade aumentada ao Recetor de Fc γ RIIIa em comparação com o anticorpo parente.

Em aspetos adicionais, a modificação aminoácido é 332E. Em algumas formas de realização preferidas, a segunda modificação de aminoácido é 239D.

Noutros aspetos, a modificação é uma modificação glicoforma que reduz o nível de fucose em relação ao anticorpo parente. Ainda noutros aspetos, a divulgação é dirigida para uma composição incluindo vários anticorpos glicosilados, em que cerca de 80-100% dos anticorpos glicosilados na composição comprehendem uma estrutura de núcleo de hidrato de carbono madura que não possui fucose.

Numa forma de realização adicional, o anticorpo reduz a ligação a Fc γ RIIb em comparação com o anticorpo anti-CD19 parente.

Em variações adicionais divulgadas, o anticorpo tem uma sequência de cadeia pesada variável selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 13-16, 20-23, e 27-44, e/ou uma sequência variável de cadeia leve selecionada a

partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 17-19, 24-26, e 45-79.

Em vários aspectos adicionais, a divulgação é dirigida para uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer dos anticorpos aqui divulgados.

Em aspectos adicionais, a divulgação é dirigida para um método para tratar a célula B relacionada com a doença por administração de um anticorpo de acordo com a reivindicação 1. Em certas variações, a doença é selecionada a partir de linfomas não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda das células B/linfoma (B-LLA), e linfoma de células do manto (LCM). Em certos aspectos, a doença é uma doença autoimune, tal como artrite reumatoide (AR), lúpus sistémico eritematoso (LSE ou lúpus), esclerose múltipla, síndrome de Sjögren, e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

Em aspectos adicionais, a divulgação é dirigida para uma composição compreendendo um anticorpo aqui descrito e um transportador aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos seguintes ilustram adicionalmente aspectos da invenção, e não são entendidos para limitar a invenção para qualquer aplicação particular ou teoria da operação.

Figura 1: Sequência de aminoácidos de CD19 homo sapiens, como obtido a partir de cDNA clone MGC:12802, IMAGEM:4054919, Número de acesso GenBank:BC006338.

Figura 2. Sequências de regiões constantes naturais de anticorpo, incluindo a cadeia leve de constante kappa

de cadeia leve, e a cadeia pesada de constante gama para IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. É também fornecida a sequência de um cadeia constante IgG Híbrida, e uma cadeia constante IgG Híbrida compreendendo as substituições 239D e I332E.

Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos das imunoglobulinas IgG humanas IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

A Figura 3a fornece as sequências dos domínios CH1 ($C\gamma 1$) e de articulação, e a Figura 3b fornece as sequências de domínios CH2 ($C\gamma 2$) e CH3 ($C\gamma 3$). As posições são numeradas de acordo com o índice EU da sequência de IgG1, e diferenças entre IgG1 e as outras imunoglobulinas IgG2, IgG3, e IgG4 são mostradas a cinzento. Existe polimorfismo alotípico num número de posições, e assim podem existir pequenas diferenças entre as sequências apresentadas e as sequências da técnica anterior. Os inícios possíveis da região Fc são marcados, aqui definidos como posição EU 226 ou 230.

Figura 4. Os haplotipos comuns da cadeia gama da IgG1 humana (Figura 4a) e IgG2 (Figura 4b) mostram as posições e as substituições relevantes de aminoácidos.

Figura 5. Formas de realização preferidas dos perfis de ligação ao recetor que incluem aumentos de, reduções de, ou sem efeito na ligação a vários receptores, onde essas mudanças podem ser benéficas em certos contextos.

Figura 6. Sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve do 4G7 original e anticorpos HD37 (H0 e L0). A Figura 6a

fornece as sequências dos domínios VH e VL, e a Figura 6b fornece as sequências das CDRs. Os limites de CDR são determinados de acordo com a convenção de Kabat (VH CDR1: 31-35b, VH CDR2: 50-65, VH CDR3: 95-102, VL CDR1: 24-34, VL CDR2: 50-56, e VL CDR3: 89-97).

Figura 7. Afinidades de ligação relativas de Híbrido 4G7 S239D/I332E e anticorpo 4G7 IgG1 a um painel de receptores Fc.

Figura 8. CMCA de Híbrido 4G7 S239D/I332E, híbrido HD37 S239D/I332E, 4G7 IgG1, HD37 IgG1, e um anticorpo de controlo negativo na linha de células Daudi (Figura 8a) e CMCA de Híbrido 4G7 S239D/I332E, 4G7 IgG1, rituximab, e um anticorpo de controlo negativo nas linhas de células SUP-B15 e Raji (Figura 8b).

Figura 9. Um ensaio de ligação de superfície celular de Híbrido 4G7 S239D/I332E às células Raji.

Figura 10. A Figura 10a mostra ensaios CMCA de Híbrido 4G7 S239D/I332E, 4G7 IgG1, e rituximab num painel de 14 linhas de células representando vários linfomas e leucemias. Ambos os parâmetros de potência (EC50) e eficácia (% CMCA) são normalizados para o rituximab (anti-CD20). A Figura 10b lista os linfomas testados e as linhas de células de leucemia.

Figura 11. Sequências da região variável de cadeia pesada com reduzida imunogenicidade para anticorpo 4G7 anti-CD19.

Figura 12. Sequências da região variável de cadeia leve com reduzida imunogenicidade para anticorpo 4G7 anti-CD19.

Figura 13. Sequências da região variável de cadeia pesada reduzida imunogenicidade para anticorpo HD37 anti-CD19.

Figura 14. Sequências da região variável de cadeia leve de reduzida imunogenicidade para anticorpo HD37 anti-CD19.

Figura 15. Resultados de um ensaio de ligação de superfície celular de variantes 4G7 de imunogenicidade reduzida a células Raji (Figura 15a) e CMCA de HD37_H2L1 Híbrido S239D/I332E e 4G7_H1L3 Híbrido S239D/I332B em células MEC-1 (Figura 15b).

Figura 16. Afinidade de ligação celular em células RS4; 11 de afinidade amadurecida 4G7 em relação a H1L1 mAb.

Figura 17. Dados de afinidade de ligação celular a células RS4;11 de variantes 4G7 incubadas durante 5 dias a 37°C, pH 9,0 em 200 mM de Tris-LCP mostrando a estabilidade melhorada obtida.

Figura 18. Sequências para variantes de cadeia pesada de anti-CD19 que aumentam a afinidade e/ou a estabilidade.

Figura 19. Sequências para variantes de cadeia leve de anti-CD19 que aumentam a afinidade e/ou a estabilidade.

Figura 20. Propriedades antiproliferativas do Híbrido 4G7 S239D/I332E em células Raji.

Figura 21. Propriedades antiproliferativas do Híbrido S239D/I332E 4G7 de estabilidade e afinidade melhoradas em células SU-DHL-6 com e sem ligação cruzada.

Figura 22. Fagocitose de células Raji e RS4;11 com Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas de 4G7.

Figura 23. CMCA Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas de 4G7 contra linhas de células de linfoma múltiplo usando células assassinas naturais (NK) purificadas.

Figura 24. Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas 4G7 que se liga a células 293T transfetadas com CD19 humanas.

Figura 25. Reatividade cruzada de estabilidade de 4G7 e afinidade melhorada do Híbrido S239D/I332E para os CD19 de conimolgos e rhésus.

Figura 26. CMCA em células RS4;11 e MEC-1 usando um anticorpo anti-CD19 de função efetora melhorada (Híbrido S239D/I332E 4G7 HIL1) com baixo conteúdo em fucose proporcionada pela expressão no sistema Lec13.

Figura 27. Substituições únicas feitas para maior estabilidade e/ou afinidade. A numeração da região variável é de acordo com Kabat. Um conjunto expandido de posições está incluído nas CDRs. Os limites da CDR canónica definidos por Kabat, como listado na Figura 6, são realçados a cinza.

Figura 28. Variantes da região variável anti-CD19 construídas para otimizar a afinidade e estabilidade.

Figura 29. Variantes preferidas e aumento relativo na afinidade de ligação versus o parente HIL1 mAb.

Figura 30. Ensaio de proliferação das células B, mostrando a capacidade de variantes de anticorpos anti-CD19 para inibir a viabilidade de células B primárias. A Figura 30a mostra a dependência da dose do anticorpo anti-mu na proliferação de células B. A Figura 30b mostra a proliferação de células B na presença de anti-mu fixado (2 mg/mL) mais concentrações variadas de anticorpos controlo da variante WT e Fc de anti-CD19, e variante Fc anti-CD3Q. Anti-Anti-CD19_IgG1_WT = 4G7_H3_L1 IgG1_WT, Anti-CD19_Hybrid_3239D/I332E = 4G7_H3_L1_Hybrid_239D/332E, e Anti-CD3Q_S239D/I332E, aqui usado como um controlo negativo, = AC10_H3.69V2_L3.71_Híbrido_239D/332E (como divulgado na US 2007/0166309, Lazar G.A. et al.).

DESCRICAÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A divulgação é direcionada para anticorpos anti-CD19 modificados e métodos para uso dos mesmos. Em vários aspectos, os anticorpos podem ter uma região Fc modificada, sequências CDR específicas, sequências de região variável, e/ou modificações da região constante. Em várias formas de realização os anticorpos são humanizados. A divulgação é além disso direcionada para métodos de uso de anticorpos em várias indicações de doença, incluindo aquelas com origem nas células B tais como linfoma não-Hodgkin de origem nas células B (LNH), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e doenças autoimunes relacionadas.

A fim de que a invenção possa ser mais completamente compreendida, várias definições são apresentadas abaixo. Essas definições são entendidas para incluir equivalentes gramaticais.

Por "CMCA" ou "citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo" como aqui usado entende-se a reação mediada por células em que células citotóxicas não específicas que expressam Fc γ Rs reconhecem anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causa a lise das células alvo. Em vários aspectos, a função efetora CMCA aumentada pode significar potência melhorada e eficácia melhorada. Por "potência" como usado no contexto experimental entende-se a concentração do anticorpo quando é observado um efeito terapêutico particular EC50 (metade da concentração máxima eficaz). Por "eficácia" como usado no contexto experimental entende-se a função efetora máxima possível a níveis de saturação de anticorpo.

Por "FCDA" ou fagocitose mediada por células dependente de anticorpo como aqui usado é considerada a reação mediada por célula em que células citotóxicas não específicas que expressam Fc γ Rs reconhecem o anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causa fagocitose da célula alvo.

Por "aminoácido" e "identidade de aminoácido" como aqui usado significa um dos 20 aminoácidos que correm naturalmente ou qualquer dos análogos não naturais que devem estar presentes numa posição definida, específica. Assim "Aminoácido" como aqui usado significa quer os aminoácidos que ocorrem naturalmente quer os sintéticos. Por exemplo, a homofenilalanina, citrulina e noreleucina são considerados aminoácidos para os fins da invenção. "Aminoácido" inclui também resíduos de iminoácidos tais como prolina e hidroxiprolina. A cadeia lateral pode ser

tanto na configuração (R) como na (S). Na forma de realização preferida, os aminoácidos estão na configuração (S) ou L. Se são usadas cadeias laterais de ocorrência não natural, podem ser usados substituintes não aminoácido, por exemplo para evitar ou retardar a degradação *in vivo*.

Por "célula B" ou "linfócito B" como aqui usado significa um tipo de linfócitos desenvolvido na medula óssea que circula no sangue e linfa, e fornece imunidade humoral. As células B reconhecem moléculas sem antígenio e diferenciam-se ou maturam nas células plasmáticas que segregam imunoglobulina (anticorpos) que inativam os抗énios. São também geradas células de memória que fazem a imimoglobulina específica (anticorpo) em encontros posteriores com tal antígeno. As células B são também conhecidas como "células Beta" no ilhéu de Langerhans.

Por "antígenio de célula B" ou "marcador de célula B" como aqui usado entende-se qualquer proteína que é expressa nas células B.

Por "CD19" como aqui usado entende-se a proteína da SEQ ID NO:1 (representada na Figura 1). CD19 é também conhecida como antígeno B4 da superfície das células B, antígeno CD19 das células B, antígeno CD19, e Leu-12. O CD19 humano é designado GeneID:930 por Gene de Entrez, e HGNC:1633 por HGNC. A CD19 pode ser codificada pelo gene chamado CD19. O uso de "CD19" aqui pretende englobar todos os alelos conhecidos ou ainda desconhecidos e formas polimórficas de CD19.

Por "CDC" ou "citotoxicidade dependente de complemento" como aqui usado entende-se a reação em que um ou mais componentes do complemento de proteína reconhece o

anticorpo ligado numa célula alvo e subsequentemente causa a lise da célula alvo.

Por "região constante" como aqui usado entende-se o polipeptídeo que inclui pelo menos uma porção das primeiras três regiões constantes de um anticorpo, com pelo menos uma função efetora. Assim a região constante refere-se portanto aos três últimos domínios da região constante de imunoglobulina de IgA, IgD, e IgG, e os últimos quatro domínios de imunoglobulina das regiões constantes de IgE e IgM, e a articulação flexível N-terminal para estes domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, a região constante inclui os domínios de imunoglobulina Cgama1, Cgama2 e Cgama3 ($C\gamma_1$, $C\gamma_2$ e $C\gamma_3$) e a articulação entre Cgama1 ($C\gamma_1$) e Cgama2 ($C\gamma_2$). Embora os limites da região constante possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida para compreender resíduos do seu terminal carboxilo, em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. A cadeia leve constante compreende tipicamente um único domínio, e como aqui definido refere-se às posições 108-214 de $C\kappa$ ou $C\lambda$, em que a numeração é de acordo com o índice EU. Para anticorpos IgG de comprimento total, a cadeia pesada constante, como aqui definido, refere-se ao N terminal do domínio CH1 para o C terminal do domínio CH3, ou posições 118-447, em que a numeração é de acordo com o índice EU. "Região constante" pode referir-se a esta região isolada, ou um truncamento ou fusão incluem anticorpos, fusões Fc, Fcs isolados, e fragmentos Fc. Em várias formas de realização, a região constante pode ser a região do anticorpo que é codificado por um dos genes da região constante das cadeias leves ou pesadas de imunoglobulina, i.e. a região de um anticorpo codificado pelas cadeias leves kappa ($C\kappa$) ou lambda ($C\lambda$). Em várias formas de realização, a cadeia pesada constante ou a região constante

de cadeia pesada pode ser a região de um anticorpo codificado por genes mu, delta, gama, alfa, ou epsilon para definir o isotipo de anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, ou IgE, respectivamente.

Por "função efetora" como aqui usada entende-se um evento bioquímico que resulta da interação de uma região Fc de anticorpo com um receptor Fc ou ligando. As funções efetoras incluem funções efetoras mediadas por FcγR tais como CMCA e FCDA, e funções efetoras mediadas por complemento tais como CDC. Por "célula efetora" como aqui usado entende-se uma célula do sistema imunitário que expressa um ou mais receptores Fc e medeia uma ou mais funções efetoras. Células efetoras incluem mas não são limitados a monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, plaquetas, células B, grandes linfócitos granulares, células de Langerhans, células assassinas (NK) naturais, e células T γδ, e podem ser de qualquer organismo incluindo mas não limitado a humanos, ratinhos, ratazanas, coelhos, e macacos.

Por "Fab" ou "região Fab" como aqui usado significa os polipeptídos que compreendem os domínios de imunoglobulina V_H, CH1, V_H, e C_L. Fab pode referir-se a esta região isoladamente, ou a esta região no contexto de um anticorpo de comprimento total ou fragmento de anticorpo.

Por "Fc" ou "região Fc", como aqui usado entende-se o polipeptído compreendendo a região constante de um anticorpo excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina de região constante. Assim Fc refere-se aos últimos domínios de imunoglobulina de duas regiões constantes do IgA, IgD, e IgG, e os últimos três domínios de imunoglobulina da região constante de IgE e IgM, e a articulação flexível N-terminal a esses domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia

J. Para IgG, Fc comprehende os domínios de imunoglobulina Cgama2 e Cgama3 (C γ 2 e C γ 3) e a articulação entre Cgama1 (C γ 1) e Cgama2 (C γ 2). Embora os limites da região Fc possam variar, uma região Fc de cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida para compreender os resíduos C226 ou P230 na sua terminação carboxilo, em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Fc pode referir-se a esta região isoladamente, ou a esta região no contexto de um polipéptido Fc, por exemplo um anticorpo. Por "polipéptido Fc" como aqui usado entende-se um polipéptido que comprehende toda ou parte de uma região Fc. Os polipéptido Fcs incluem anticorpos, fusões Fc, Fcs isolados, e fragmentos de Fc.

Por "recetor Fc gama" ou "Fc γ R" como aqui usado entende-se qualquer membro da família das proteínas que ligam região Fc do anticorpo IgG. Em várias formas de realização, os Fc γ R são substancialmente codificados pelos genes Fc γ R. Em humanos esta família inclui mas não é limitada a Fc γ R1 (CD64), incluindo as isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb, e Fc γ RIC; Fc γ RII (CD32), incluindo as isoformas Fc γ RIIa (incluindo os alotipos H131 e R131), Fc γ RIIb (incluindo Fc γ RIIb-1 e Fc γ RIIb-2), e Fc γ RIIC; e Fc γ RIII (CD16), incluindo as isoformas Fc γ RIIIa (incluindo os alotipos V158 e F158) e Fc γ RIIIb (incluindo os alotipos Fc- γ RIIIb-NA1 e Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65), assim como quaisquer isoformas Fc γ Rs ou Fc γ R ou alotipos humanos desconhecidos. Os Fc γ Rs de ratinho incluem mas não são limitados a Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), e Fc γ RIII-2 (CD16-2), assim como qualquer isoformas Fc γ Rs ou Fc γ R ou alotipos de ratinho desconhecido. Um Fc γ R pode ser desde qualquer organismo, incluindo mas não limitado a humanos, ratinhos, ratazanas, coelhos, e macacos.

Por "ligando Fc" ou "recetor Fc" como aqui usado entende-se uma molécula, preferencialmente um polipéptido, a partir de qualquer organismo que se liga à região Fc de um anticorpo para formar um complexo Fc-ligando. Os ligandos Fc incluem mas não são limitados a Fc γ Rs, FcRn, C1q, C3, lectina de ligação a manano, recetor de manose, proteína estafilocócica A, proteína estreptocócica G, e Fc γ R viral. Os ligandos Fc também incluem homólogos de recetor Fc (FcRH), que são uma família de recetores Fc que são homólogos para Fc γ Rs (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Os ligandos Fc podem incluir moléculas não descobertas que ligam Fc.

Por "IgG" como aqui usado entende-se um polipéptido pertencente à classe dos anticorpos que são substancialmente codificados por um gene de gama imunoglobulina reconhecido. Em humanos esta classe compreende IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em ratinhos esta classe compreende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Por "imunoglobulina (Ig)" aqui entende-se uma proteína consistindo de um ou mais polipéptidos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina. As imunoglobulinas incluem mas não são limitadas a anticorpos. As imunoglobulinas podem ter várias formas estruturais, incluindo mas não limitadas a anticorpos de comprimento total, fragmentos de anticorpo, e domínios de imunoglobulina individual. Por "domínio de imunoglobulina (Ig)" aqui entende-se uma região de uma imunoglobulina (Ig) que existe como uma entidade estrutural distinta como verificado, por um especialista na técnica de estrutura de proteínas. Os domínios Ig tipicamente têm uma topologia de dobragem em sanduíche β característica. Os domínios Ig conhecidos na classe IgG de anticorpos são VH, Cy1, Cy2, Cy3, VL, e CL.

Por "modificação" aqui entende-se uma alteração nas propriedades físicas, químicas, ou sequência de uma proteína, polipéptido, anticorpo, ou imunoglobulina. Modificações preferidas da invenção são modificações de aminoácido e modificações de glicoforma.

Por "modificação de aminoácido" aqui entende-se uma substituição, inserção, e/ou deleção de aminoácido numa sequência de polipéptido. Por "substituição de aminoácido" ou "substituição" aqui entende-se a substituição de um aminoácido numa posição particular numa sequência de polipéptido parente por outro aminoácido. Por exemplo, a substituição I332E refere-se a um polipéptido variante, neste caso uma variante constante de cadeia pesada, na qual a isoleucina na posição 332 é substituída por ácido glutâmico. O resíduo WT pode ou não ser designada. No exemplo anterior, 332E indica a substituição da posição 332 com um ácido glutâmico. Para os fins presentes, múltiplas substituições são tipicamente separadas por uma barra. Por exemplo, 239D/332E refere-se a uma variante dupla compreendendo as substituições 239D e 332E. Por "inserção de aminoácido" ou "inserção" como aqui usado entende-se a adição de um aminoácido na posição particular numa sequência de polipéptido parente. Por exemplo, inserir -236 designa uma inserção de glicina na posição 236. Por "deleção de aminoácido" ou "deleção" como aqui usado entende-se a remoção de um aminoácido na posição particular numa sequência de polipéptidos parente. Por exemplo, G236- designa a deleção da glicina na posição 236.

Por "modificação de glicoforma" ou "glicoforma modificada" ou "glicoforma modificada geneticamente" como aqui usado entende-se uma composição hidrato de carbono que está ligada covalentemente a uma proteína, por exemplo um anticorpo, em que a referida composição hidrato de carbono

difere quimicamente da de uma proteína parente. Glicoforma modificada tipicamente refere-se a diferentes hidrato de carbono ou oligossacáridos; assim por exemplo um anticorpo pode compreender uma glicoforma modificada. Em alternativa, a glicoforma modificada pode referir-se ao anticorpo que compreende o hidrato de carbono ou oligossacárido diferente.

Por "polipéptido parente", "proteína parente", "polipéptido precursor", ou "proteína precursora" como aqui usados entende-se um polipéptido não modificado que é subsequentemente modificado para gerar uma variante. O referido polipéptido parente pode ser um polipéptido que ocorre naturalmente, ou uma variante ou versão geneticamente modificada de um polipéptido que ocorre naturalmente. Polipéptido parente pode referir-se ao próprio polipéptido, as composições que compreendem o polipéptido parente, ou a sequência de aminoácidos que o codifica. Consequentemente, por "anticorpo parente" ou "imunoglobulina parente" como aqui usado entende-se um anticorpo ou imunoglobulina que é modificada para gerar uma variante. Por "anticorpo anti-CD19 parente" ou "imunoglobulina anti-CD19 parente" como aqui usado entende-se um anticorpo ou imunoglobulina que liga CD19 e é modificada para gerar uma variante.

Por "proteína" ou "polipéptido" como aqui usado entende-se pelo menos dois aminoácidos ligados covalentemente, que incluem proteínas, polipéptidos, oligopéptidos e péptidos. A proteína pode ser efetuada de aminoácidos que ocorrem naturalmente e ligações peptídicas, ou estruturas peptidomiméticas sintéticas, i.e. "análogos", tais como peptóides.

Por "posição" como aqui usado entende-se a localização na sequência de uma proteína. As posições podem ser numeradas sequencialmente, ou de acordo com um formato estabelecido, por exemplo o índice EU como em Kabat. Posições correspondentes são determinadas como aqui realçado, geralmente através de alinhamento com outras sequências parentes.

Por "resíduo" como aqui usado entende-se a posição numa proteína e a sua identidade de aminoácido associada. Por exemplo, a Asparagina 297 (também referida como Asn297 e N297) é um resíduo na posição 297 no anticorpo IgG1 humano.

Por "antigénio alvo" ou "alvo" ou "antigénio" como aqui usado entende-se a molécula que está ligada especificamente pela região variável de um dado anticorpo. Um antigénio alvo pode ser uma proteína, hidrato de carbono, lípido, ou outro composto químico. Por "célula alvo" como aqui usado entende-se uma célula que expressa um antigénio alvo.

Por "região variável" entende-se a região variável de uma cadeia pesada ou da cadeia leve de anticorpo. A região variável de cadeia pesada (VH), como aqui definido, refere-se à terminação N à terminação C do domínio VH, definida pelos resíduos 1-113 de acordo com a convenção de numeração de Kabat. A região variável de cadeia leve (VL), como aqui definido, refere-se à terminação N terminal da terminação C do domínio VL, definida pelos resíduos 1-107 de acordo com a convenção de numeração de Kabat. Os especialistas na técnica reconhecerão que a convenção da numeração da região variável de Kabat emprega letras para contar o comprimento variável de CDRs. Assim uma VH é definida pelos resíduos 1-113 de Kabat, e que uma VL é definida por 1-107 de Kabat, não significa necessariamente que o domínio VH contenha exatamente 113 resíduos, nem que VL contenha exatamente 107

resíduos. Em vez disso, os resíduos 1-113 de VH e 1-107 de VL de acordo com Kabat destinam-se a englobar os domínios estruturais que foram determinados pelos alinhamentos da sequência de um largo conjunto de regiões variáveis de anticorpo de comprimento variável (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Em certas formas de realização, a região variável pode compreender um ou mais domínios Ig codificados substancialmente por qualquer dos genes V_{κ} , V_{λ} , e/ou V_H que constituem os locais genéticos de imunoglobulina kapa, lambda, e de cadeia pesada, respectivamente.

Por "proteína variante", "variante de proteína", "polipéptido variante", ou "variante de polipéptido" como aqui usado entende-se uma sequência de polipéptido que difere da de uma sequência do polipéptido parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Polipéptido variante pode referir-se ao próprio polipéptido, uma composição compreendendo o polipéptido, ou a sequência amino que o codifica. Preferencialmente, o polipéptido variante tem pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação com o polipéptido parente, por exemplo desde cerca de uma até cerca de dez modificações de aminoácido, e preferencialmente desde cerca de uma até cerca de cinco modificações de aminoácido em comparação com o parente. A sequência de polipéptido variante aqui preferencialmente possuirá pelo menos cerca de 80% de homologia com uma sequência de polipéptido parente, e o mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% de homologia, mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% de homologia. Consequentemente, por "anticorpo variante" ou "variante de anticorpo" como aqui usado entende-se uma sequência de anticorpo que difere da sequência de anticorpo

parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Variante de anticorpo pode referir-se ao próprio anticorpo polipéptido, composições compreendendo o anticorpo polipéptido variante, ou a sequência de aminoácidos que a codifica. Consequentemente, por "variante de anticorpo" ou "variante de anticorpo" como aqui usado entende-se um anticorpo, conforme definido acima, que difere na sequência da sequência do anticorpo parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Anticorpo variante pode referir-se à própria proteína, as composições compreendendo a proteína, ou a sequência de aminoácidos que a codifica. Consequentemente, por "variante constante de cadeia pesada" ou "variante constante de cadeia leve" ou "Variante Fc" como aqui usado entende-se a constante de cadeia pesada, constante cadeia leve, ou polipéptido ou sequência da região Fc, respectivamente, que difere na sequência da de uma sequência parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido.

Por "tipo selvagem ou WT" aqui entende-se uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleótidos que é encontrada na natureza, incluindo as variações alélicas. A proteína WT, polipéptido, anticorpo, imunoglobulina, IgG, etc., têm uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleótidos que não foi intensionalmente modificada.

Para todas as posições da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina discutidas na presente invenção, a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). O "índice EU como em Kabat" refere-se à numeração de resíduo do anticorpo IgG1 EU humano, como descrito em Edelman et al., 1969, Biochemistry 63:78-85.

Anticorpos

Como aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína monomérica ou multimérica compreendendo uma ou mais cadeias de polipéptidos. Um anticorpo liga-se especificamente a um抗原 (por exemplo CD19) e pode ser capaz de modular a atividade biológica do抗原. Como aqui usado, o termo "anticorpo" pode incluir "anticorpo de comprimento total" e "polipeptídeo Fc."

Por "anticorpo de comprimento total" aqui entende-se a estrutura que constitui a forma biológica natural de um anticorpo, incluindo as regiões variável e constante. Por exemplo, na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e ratinhos, o anticorpo de comprimento total da classe IgG é um tetrâmero e consiste de dois pares idênticos de duas cadeias de imunoglobulina, cada par com uma cadeia leve e uma pesada, cada cadeia leve compreendendo domínios de imunoglobulina VL e CL, e cada cadeia pesada compreendendo os domínios de imunoglobulina VH, CH1 (C γ 1), CH2 (C γ 2), e CH3 (C γ 3). Em alguns mamíferos, por exemplo em camelos e lamas, os anticorpos IgG podem consistir somente de duas cadeias pesadas, cada cadeia pesada compreendendo um domínio variável ligado à região Fc.

O termo "anticorpo" inclui também fragmentos de anticorpo. Os fragmentos específicos de anticorpo incluem, mas não são limitados a, (i) o fragmento Fab que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1, (ii) o fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1, (iii) o fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) o qual consiste de uma única variável, (v) regiões CDR isoladas, (vi) fragmentos F(ab') $_2$, um fragmento bivalente compreendendo

dois fragmentos Fab ligados (vii) moléculas Fv de cadeia simples (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL são ligados por um ligante peptídico o qual permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação a抗igénio (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) dímeros Fv de cadeia única biespecífica (WO 93/11161) e (ix) "diacorpos" ou "triacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de genes (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448). Em certas formas de realização, os anticorpos são produzidos por técnicas de DNA recombinante. Outros exemplos de formatos e arquiteturas de anticorpo são descritos em Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, e Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357 e referências aqui citadas. Em formas de realização adicionais, os anticorpos são produzidos por clivagem enzimática ou química dos anticorpos que ocorrem naturalmente.

Unidades estruturais de anticorpo natural tipicamente compreendem um tetrâmero. Cada tetrâmero é tipicamente composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par com uma cadeia "leve" (tipicamente com um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (tipicamente com um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). Cada uma das cadeias leves e pesadas são constituídas por duas regiões distintas, referidas como regiões variável e constante. Para a classe IgG de imunoglobulinas, a cadeia pesada é composta por quatro domínios de imunoglobulina ligados da terminação N- à C- pela ordem VH-CH1-CH2-CH3, em relação ao domínio variável de cadeia pesada, domínio constante 1 de cadeia pesada, domínio constante 2 de cadeia pesada, e domínio constante 3 de cadeia pesada.

respetivamente (também referido como VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3 em relação ao domínio variável de cadeia pesada, domínio constante gama 1, domínio constante gama 2, e domínio constante gama 3 respetivamente). A Cadeia leve de IgG é composta por dois domínios de imunoglobulina ligados da terminação N- para a C pela ordem V_L-C_L, em relação ao domínio variável de cadeia leve e o domínio constante de cadeia leve respetivamente. As regiões constantes mostram menor diversidade de sequência, e são responsáveis pela ligação de algumas das proteínas naturais para eliciar eventos bioquímicos importantes.

A região variável de um anticorpo contém os determinantes de ligação a antigénio de uma molécula, e assim determina a especificidade de um anticorpo para o seu antigénio alvo. A região variável é assim chamada porque é a mais distinta na sequência dos outros anticorpos dentro da mesma classe. Na região variável, estão reunidas três ansas para cada um dos domínios V de cadeia pesada e cadeia leve para formar um sítio de ligação a antigénio. Cada uma das ansas é referida como uma região de determinação de complementaridade (de aqui em diante referida como uma "CDR"), na qual a variação na sequência de aminoácidos é a mais significativa. Há um total de 6 CDRs, três para cada cadeia pesada e leve, designadas V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2, e V_L CDR3. A região variável fora das CDRs é referida como a região estrutural (FR). Embora não seja tão diversa como as CDRs, a variabilidade de sequência ocorre na região FR entre diferentes anticorpos. Acima de tudo, esta arquitetura característica dos anticorpos fornece uma base estável (a região FR) na qual substancial diversidade de ligação a antigénio (as CDRs) pode ser explorada pelo sistema imunitário para obter especificidade para uma ampla gama de antigénios. Um certo número de estruturas de alta resolução estão disponíveis para uma diversidade de

fragmentos de região variável de diferentes organismos, alguns não ligados e alguns complexados com o抗igénio. As características estruturais e de sequência das regiões variáveis de anticorpo são divulgadas, por exemplo, em Morea et al., 1997, Biophys Chem 68:9-16; Morea et al., 2000, Methods 20:267-279, e as características conservadas dos anticorpos são divulgadas, por exemplo, em Maynard et al., 2000, Annu Ver Biomed Eng 2:339-376.

Os anticorpos são agrupados em classes, também referidas como isotipos, como determinado geneticamente pela região constante. As cadeias leves constantes humanas são classificadas como cadeias leves kappa ($C\kappa$) e lambda ($C\lambda$). As cadeias pesadas são classificadas como mu, delta, gama, alfa, ou epsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. A classe IgG é a mais comumente usada para fins terapêuticos. Em humanos esta classe compreende as subclasses IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Em ratinhos esta classe compreende as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. A IgM tem subclasses, incluindo, mas não limitadas a, IgM1 e IgM2. A IgA tem várias subclasses, incluindo mas não limitada a IgA1 e IgA2. Assim, "isotipo" como aqui usado significa qualquer das classes ou subclasses de imunoglobulinas definidas pelas características químicas e抗igénicas das suas regiões constantes. Os isotipos de imunoglobulina humana conhecidos são IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE. A Figura 2 fornece as sequências da cadeia leve humana kappa e das cadeias constantes de cadeia pesada gama. A Figura 3 mostra um alinhamento de cadeias pesadas constantes da IgG humana.

Para a invenção podem também ser úteis as IgGs que são composições híbridas de isotipos de IgG naturais humanos. Funções efetoras tais como CMCA, FCDA, CDC, e meia vida

sérica diferem significativamente entre as diferentes classes de anticorpos, incluindo por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, e IgM humanas (Michaelsen et al., 1992, Molecular Immunology, 29(3): 319-326). Uma série de estudos têm explorado as variantes IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 a fim de investigar os determinantes das diferenças da função efetora entre elas. Ver por exemplo Canfield & Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491; Chappel et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(20): 9036-9040; Chappel et al., 1993, Journal of Biological Chemistry 268:25124-25131; Tao et al., 1991, J. Exp. Med. 173:1025-1028; Tao et al., 1993, J. Exp. Med. 178:661-667; Redpath et al., 1998, Human Immunology, 59, 720-727.

Como descrito na US 2006/0134105, intitulada "IgG Immunoglobulin Variants with Optimized Effector Function", é possível manipular modificações de aminoácido num anticorpo que compreende as regiões constantes de outras classes de imunoglobulina, por exemplo como as ilustradas nos alinhamentos na Figura 3. Essas composições de IgG híbridas manipuladas podem fornecer propriedades de função efetora melhoradas, incluindo CMCA, fagocitose, CDC, e meia vida sérica melhorados. Por exemplo, como ilustrado pela Figura 3, uma variante híbrida IgG1/IgG3 pode ser construída por substituição das posições IgG1 nas regiões CH2 e CH3 com os aminoácidos da IgG3 em posições onde os dois isotipos diferem. Portanto um anticorpo variante híbrido IgG pode ser construído para compreender uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo que consiste em: 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, e 436F, em que a numeração é de acordo com o índice EU. Essas variantes podem fornecer propriedades de função efetora alternativas e/ou melhoradas.

Como outro exemplo, a função efetora relativamente pobre da IgG2 pode ser melhorada substituindo os resíduos chave de ligação a Fc γ R com os correspondentes aminoácidos numa IgG com melhor função efetora. Por exemplo, as diferenças entre os resíduos chave entre IgG2 e IgG1 em relação a ligação Fc γ R podem incluir P233, V234, A235, -236 (referente à deleção em IgG2 em relação a IgG1), e G327. Portanto uma ou mais modificações de aminoácido na IgG2 parente em que um ou mais desses resíduos é substituído com os correspondentes aminoácidos IgG1, P233E, V234L, A235L, -236G (referente a uma inserção de uma glicina na posição 236), e G327A, pode fornecer função efetora aumentada. A sequência de uma tal IgG, compreendendo um híbrido de resíduos de IgG1 e IgG2, aqui referida como "Híbrida" nos Exemplos e Figuras, é fornecida na Figura 2.

Tal como é conhecido na técnica, o polimorfismo da imunoglobulina existe na população humana. O polimorfismo da Gm é determinado pelos genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 os quais têm alelos que codificam determinantes antigénicos alotípicos referido como alotipos G1m, G2m, eG3m para marcadores das moléculas IgG1, IgG2 e IgG3 humano (nenhuns alotipos Gm foram encontrados na cadeia 4 gama). Os marcadores podem ser classificados em 'alotipos' e 'isoalotipos'. Estes são identificados em diferentes bases sorológicas dependentes de uma forte homologias de sequências entre isotipos. Os alotipos são determinantes antigénicos especificados por formas alélicas dos genes Ig. Os alotipos representam pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos das cadeias pesada e leve de diferentes indivíduos. Mesmo uma única diferença de aminoácido pode dar origem a um determinante alelotípico, embora em muitos casos sejam várias as substituições de aminoácidos que ocorrem. Os alotipos são diferenças de sequência entre alelos de uma subclasse pelo que os anti-soros reconhecem

apenas as diferenças alélicas. Um isoalotipo é um alelo num isotipo que produz um epitopo que é partilhado com uma região homóloga não polimórfica de um ou mais de outros isotipos e por isto o antisoro irá reagir com alotipos relevantes e com os isotipos homólogos relevantes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, *Chem Immunol.* 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, *Semin Immunol* 2(6):457-66).

As formas alélicas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. *J Immunogen* 1976, 3:357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, *Eur. J. Immunol.* 6, 599-601; E. van Loghem, 1986, Allotypic markers, *Monogr Allergy* 19: 40-51). Adicionalmente, outros polimorfismos foram caracterizados (Kim et al., 2001, *J. Mol. Evol.* 54:1-9). Atualmente, são conhecidos 18 alotipos Gm: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, *Hum. Genet.*: 50, 199-211). Os alotipos que são herdados em combinações fixadas são chamados haplotipos Gm. A Figura 4 mostra haplotipos comuns da cadeia gama de IgG1 humano (Figura 4a) e IgG2 (Figura 4b) mostrando as posições e as substituições de aminoácidos relevantes. As sequências de aminoácidos destas versões alotípicas de IgG1 e IgG2 são fornecidas como SEQ IDs: 80-85. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por qualquer alotipo, isoalotipo, ou haplotipo de qualquer gene de imunoglobulina.

Formas alélicas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of imunoglobulinas humanas. 1976, Eur. J. Iminunol. 6, 599-601; E. van Loghem, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51). Adicionalmente, outros polimorfismos foram caracterizados (Kim et al., 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9). Presentemente, são conhecidos 18 alotipos Gm: Glm (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Al4otipos que são herdados em combinações fixas são chamados haplotipos Gm. A Figura 4 mostra haplotipos comuns da cadeia gama de IgG1 humana (Figura 4a) e IgG2 (Figura 4b) mostrando as posições e as substituições de aminoácidos relevantes. Os anticorpos da presente invenção podem ser substancialmente codificados por qualquer alotipo, isoalotipo, ou haplotipo de qualquer gene de imunoglobulina.

Os anticorpos aqui divulgados podem ser substancialmente codificados por genes de qualquer organismo, preferencialmente mamíferos, incluindo mas não limitado a humanos, roedores incluindo mas não limitado a ratinhos e ratos, lagomorfos incluindo mas não limitado a coelhos e lebres, camelídeos incluindo mas não limitado a camelos, lamas, e dromedários, e primatas não humanos, incluindo mas não limitado a Prossímios, Platyrrhini (macacos do Novo Mundo), Cercopithecoidea (macacos do Velho Mundo), e Hominoidea incluindo os Gibões e Macacos Menores e Grandes. Numa forma de realização mais preferida, os anticorpos da

presente invenção são substancialmente humanos. Os anticorpos aqui divulgados podem ser substancialmente codificados por genes de imunoglobulina pertencentes a qualquer das classes de anticorpo. Numa forma de realização mais preferida, os anticorpos da presente invenção compreendem sequências pertencentes à classe de anticorpos IgG, incluindo subclasses de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 humanas. Os anticorpos aqui divulgados podem compreender sequências pertencentes às classes de anticorpos IgA (incluindo subclasses IgA1 e IgA2 humanas), IgD, IgE, IgG, ou IgM. Os anticorpos aqui divulgados podem compreender mais do que uma cadeia de proteína. Ou seja, a presente invenção pode encontrar uso num anticorpo que é um monómero ou um oligómero, incluindo um homo- ou hetero-oligómero.

Na forma de realização mais preferida, os anticorpos da invenção baseiam-se em sequências de IgG humanas, e assim as sequências de IgG humanas são usadas como sequências "base" em relação às quais outras sequências são comparadas, incluindo mas não limitado a sequências de outros organismos, por exemplo sequências de roedores e primatas, assim como sequências de outras classes de imunoglobulina tais como IgA, IgE, IgGD, IgGM, e as afins. É divulgado que, embora os anticorpos da presente invenção sejam manipulados no contexto de um anticorpo parente, as variantes podem ser manipulados em ou "transferidos" para o contexto de outro, segundo anticorpo parente. Isto é realizado determinando os resíduos e substituições "equivalentes" ou "correspondentes" entre o primeiro e segundo anticorpo, tipicamente com base na homologia de sequência ou estrutural entre as sequências dos dois anticorpos. Com vista a estabelecer a homologia, a sequência de aminoácidos de um primeiro anticorpo aqui evidenciado é diretamente comparado com a sequência de um segundo anticorpo. Após o alinhamento das sequências,

usando um ou mais dos programas de alinhamento de homologia conhecidos na técnica (por exemplo usando resíduos conservados como entre espécies), permitindo as necessárias inserções e deleções com vista a manter o alinhamento (i.e., evitando a eliminação de resíduos conservados através de deleção e inserção arbitrária), são definidos os resíduos equivalentes de aminoácidos específicos na sequência primária do primeiro anticorpo. O alinhamento de resíduos conservados preferencialmente deve conservar 100% desses resíduos. No entanto, um alinhamento superior a 75% ou tão baixo como 50% dos resíduos conservados é também adequado para definir os resíduos equivalentes. Os resíduos equivalentes podem também ser definidos determinando a homologia estrutural entre um primeiro e um segundo anticorpo ou seja ao nível da estrutura terciária para anticorpos cujas estruturas foram determinadas. Neste caso, os resíduos equivalentes são definidos como aqueles para os quais as coordenadas atómicas de dois ou mais dos principais átomos da cadeia de um resíduo de aminoácido particular do parente ou precursor (N em N, CA em CA, C em C e O em O) estão dentro de 0,13 nm e preferencialmente 0,1 nm após alinhamento. O alinhamento é atingido após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para dar a sobreposição máxima de coordenadas atómicas de átomos de proteína não hidrogénio das proteínas. Independentemente de como os resíduos equivalentes ou correspondentes são determinados, e independentemente da identidade do anticorpo parente em que os anticorpos são feitos, o que se pretende transmitir é que os anticorpos divulgados pela presente invenção podem ser manipulados em qualquer segundo anticorpo parente que tenha homologia de sequência ou estrutural significativa com o referido anticorpo. Portanto por exemplo, se é gerado um anticorpo variante em que o anticorpo parente é IgG1 humano, usando os métodos descritos acima ou outros métodos para determinar os

resíduos equivalentes, o referido anticorpo variante pode ser manipulado num anticorpo progenitor de IgG2 humano, num anticorpo parente IgA humano, num anticorpo parente IgG2a ou IgG2b de rato, e afins. Novamente, como descrito acima, o contexto do anticorpo parente não afeta a capacidade para transferir os anticorpos da presente invenção para outros anticorpos parentes. Por exemplo, as variantes de anticorpo que são manipuladas num anticorpo IgG1 humano que tem como alvo um epítopo do antigénio pode ser transferido para um anticorpo IgG2 humano que visa um epítopo do antigénio diferente, e assim por diante.

Na classe IgG das imunoglobulinas, existem vários domínios de imunoglobulina na cadeia pesada. Por "domínio de imunoglobulina (Ig)" é aqui pretendida uma região de uma imunoglobulina (Ig) com uma estrutura terciária distinta. Com interesse para a presente invenção são os domínios de cadeia pesada constante, (incluindo, uns domínios de pesada constante (CH) e a articulação. No contexto dos anticorpos IgG, cada um dos isotipos IgG tem três regiões CH: "CH1" refere-se às posições 118-220, "CH2" refere-se às posições 237-340, e "CH3" refere-se às posições 341-447 de acordo com o índice EU como em Kabat. Por "articulação" ou "região de articulação" ou "região de articulação de anticorpo." ou "região de articulação de imunoglobulina" aqui entende-se o polipeptído flexível compreendendo os aminoácidos entre os primeiro e o segundo domínios constantes de um anticorpo. Estruturalmente, a extremidade do domínio IgG CH1 na posição 220 de EU, e o domínio IgG CH2 começa na posição 237 de EU do resíduo. Assim, para a IgG a articulação é aqui definida para incluir as posições 221 (D221 em IgG1) até 236 (G236 em IgG1), em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Em algumas formas de realização, por exemplo no contexto de uma região Fc, a articulação mais baixa está incluída, com a "articulação inferior"

geralmente referente às posições 226 ou 230. A cadeia pesada constante, como aqui definida, refere-se ao N terminal do domínio CH1 ao C terminal do domínio CH3, compreendendo, assim, as posições 118-447, em que a numeração é de acordo com o índice EU. A cadeia leve constante comprehende um único domínio, e como aqui definido refere-se às posições 108-214 de C_k ou C_λ, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Os anticorpos aqui divulgados podem incluir anticorpos multiespecíficos, notavelmente anticorpos biespecíficos, também por vezes referidos como "diacorpos". Estes são anticorpos que se ligam a dois (ou mais)抗原s diferentes. Os diacorpos podem ser fabricados por uma diversidade de modos conhecidos na técnica, por exemplo, preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos. Numa forma de realização, o antícorpo é um minicorpo. Os minicorpos são proteínas do tipo antícorpo minimizado compreendendo um scFv ligado a um domínio CH3. Em alguns casos, o scFv pode estar ligado à região Fc, e pode incluir algum ou todos os da região de articulação. Para uma descrição de anticorpos multiespecíficos ver Hollinger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 e referências aqui citadas.

Adicionalmente divulgado é que o antícorpo é um fragmento de anticorpo. De especial interesse são os anticorpos que compreendem regiões Fc, fusões Fc, e a região constante da cadeia pesada (CH1-articulação-CH2-CH3). Os anticorpos aqui divulgados podem compreender fragmentos Fc. Um fragmento Fc como aqui divulgado pode compreender desde 1 - 90% da região Fc, com 10 - 90% sendo preferido, e 30 - 90% sendo o mais preferido. Assim, por exemplo, um fragmento Fc como aqui divulgado pode compreender um domínio IgG1 C_γ2, um domínio IgG1 C_γ2 e a região de articulação, um domínio IgG1

Cγ3, e assim por diante. Um fragmento Fc como aqui divulgado pode compreender adicionalmente um parceiro de fusão, tornando-o efetivamente uma fusão de fragmento Fc. Os fragmentos Fc podem ou não conter uma sequência de polipeptído extra.

Anticorpos quiméricos, humanizados, e completamente humanos

A imunogenicidade é o resultado de uma série de respostas complexas a uma substância que é reconhecida como estranha, e pode incluir a produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, a formação de complexos imunológicos, a ativação de complemento, ativação de mastócitos, inflamação, respostas de hipersensibilidade, e anafilaxia. Vários fatores podem contribuir para a imunogenicidade da proteína, incluindo mas não limitado a sequência de proteína, via e frequência de administração, e população doente. A imunogenicidade pode limitar a eficácia e a segurança da proteína terapêutica de múltiplos modos. A eficácia pode ser reduzida diretamente pela formação de anticorpos neutralizantes. A eficácia pode ser também reduzida indiretamente, por ligação ou a anticorpos neutralizantes ou a não neutralizantes tipicamente conduz a eliminação rápida do soro. Podem ocorrer efeitos secundários graves e mesmo morte quando aparece uma reação imunológica. Assim, numa forma de realização preferida a manipulação de proteínas é usada para reduzir a imunogenicidade dos anticorpos da presente invenção.

Em algumas formas de realização, os componentes da estrutura podem ser uma mistura de espécies diferentes. Esse anticorpo pode um anticorpo químico e/ou um anticorpo humanizado. Em geral, tanto os "anticorpos quiméricos" como os "anticorpos humanizados" referem-se a anticorpos que combinam regiões de mais de uma espécie. Os

"Anticorpos quiméricos" tradicionalmente compreendem região(ões) variável(eis) de um ratinho (ou rato, em alguns casos) e a(s) região(ões) constante(s) de um humano (Morrison et al., 1984, Proc Natl Acad Sci USA 81: 6851-6855).

Por anticorpo "humanizado" como aqui usado entende-se um anticorpo compreendendo uma região estrutural humana (FR) e uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDR's) de um anticorpo não humano (usualmente ratinho ou rato). O anticorpo não humano EP fornecendo as CDR's é chamado o "dador" e a imunoglobulina humana que fornece a estrutura é chamada o "aceitador". Em certas formas de realização, a humanização assenta principalmente sobre a inserção de enxertos de CDRs dadoras nas estruturas VL e VH do aceitador (humano) (Winter US 5225539). Esta estratégia é referida como "enxerto de CDR". A "Retromutação" dos resíduos da estrutura do aceitador selecionado nos correspondentes resíduos dadores é muitas vezes necessária para recuperar a afinidade que é perdida na construção do enxerto inicial (US 5693762). O anticorpo humanizado otimamente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Ig), tipicamente a da imunoglobulina humana, e portanto, tipicamente, irá compreender uma região Fc humana. Uma multiplicidade de técnicas e métodos para humanizar e reformular anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica (Ver Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), e as referências aqui citadas). A humanização ou outros métodos de redução da imunogenicidade de regiões variáveis de anticorpo não humano pode incluir métodos de recapeamento, como descrito por exemplo em Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973. Numa forma de realização, a seleção de métodos baseados na seleção podem

ser empregues em regiões variáveis de anticorpo humanizado e/ou de afinidade madura, quer dizer, para aumentar a afinidade da região variável para o seu抗igenio alvo. Outros métodos de humanização podem envolver o enxerto somente de partes das CDRs, incluindo mas não limitado a métodos descritos na US 2002/0034765; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084. Podem ser empregues métodos com base na estrutura para maturação da humanização e afinidade, por exemplo como descrito na US 2002/0177170 e pedidos relacionados.

Em certas variações, a imunogenicidade do anticorpo é reduzida usando um método descrito na US 2006/0008883, intitulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof".

As modificações para reduzir a imunogenicidade podem incluir modificações que reduzem a ligação do péptido processado derivado da sequência parente às proteínas MHC. Por exemplo, as modificações de aminoácido devem ser manipuladas de modo a que não sejam ou que só um número mínimo dos epítópos imunológicos seja previsto ligar-se, com alta afinidade, a quaisquer alelos MHC prevalentes. Vários métodos de identificação de epitópos ligados a MHC nas sequências de proteína são conhecidos na técnica e podem ser usados para medir os epitópos num anticorpo da presente invenção. Ver por exemplo US 2002/0119492, US 2004/0230380, US 2006/0148009, e referências aí citadas.

Os anticorpos aqui divulgados podem ser totalmente humanos, ou seja as sequências dos anticorpos são completamente ou substancialmente humanas. "Anticorpo totalmente humano" ou "anticorpo completamente humano" refere-se a um anticorpo humano com a sequência de gene de um anticorpo derivado de

um cromossoma humano com as modificações aqui sublinhadas. São conhecidos na técnica vários métodos para gerar anticorpos totalmente humanos, incluindo o uso de ratinhos transgénicos (Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458,) ou bibliotecas de anticorpos humanos ligadas a métodos de seleção (Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108).

Anticorpos que visam CD19

Os anticorpos como aqui divulgados podem apresentar seletividade para CD19 versus alvos alternativos, ou seletividade para uma forma específica do alvo versus formas alternativas. Exemplos incluem comprimento total versus variantes de emenda, formas superfície celular versus formas solúveis, seletividade para várias variantes polimórficas, ou seletividade para formas conformacionais específicas de um alvo. Um anticorpo como aqui divulgado pode ligar qualquer epitopo ou região no CD19, e pode ser específico para fragmentos, formas mutantes, formas de emenda, ou formas aberrantes dos referidos抗ígenos. Anticorpos ou imunoadesinas adequados incluem os anticorpos CD19 ou imunoadesinas em MT-103 (um anticorpo de cadeia simples bispecífico CD19/CD3; Hoffman, P. et al. 2005. Int. J. Cancer. 115: 98-104; Schlereth, B. et al. 2006. Cancer Immunol. Immunother. 55: 503-514), um diacorpo CD19/CD16 (Schlenzka, J. et al. 2004. Anti-cancer Drugs. 15: 915-919; Kipriyanov, S.M. et al. 2002. J. Immunol. 169: 137-144), BU12-saporin (Flavell, D.J. et al. 1995. Br. J. Cancer. 72: 1373-1379), e anti-CD19-idarubicina (Rowland, A.J. et al. 1993. Cancer Immunol. Immunother. 55: 503-514); Olson, US Pub. No. 2004/0136908A1, registada em 4 de março, 2004; US 5,686,072; Olson, WO 02/080987A1, registada em 29 de março, 2002; Tedder, WO 06/133450A1, registada em 8 de junho, 2006; Tedder, WO 06/121852A2, registada em 5 de abril,

2006; Tedder, WO 06/089133A2, registada em 15 de fev., 2006; Tedder, US Pub. No. 2006/280738A1, registada em 8 de jun., 2006; US 7,109,304; Hansen, US Pub. No. 2005/070693A1, registada em 2 de agosto., 2004; Hansen, US Pub. No. 2006/257398A1, registada em 1 de jun., 2006; Hansen, WO 05/012493A2, registada em 2 de agosto., 2004; Rao-Naik, WO 07/002223A2, registada em 20 de jun., 2006; Page, US Pub. 2002/182208A1, registada em 16 de maio, 2002; US 5,686,072; Page, EP00481790B1, registada em 17 de out., 1991; Hariharan, US Pub. No. 2003/103971A1, registada em 12 de set., 2002; Goldenberg, US Pub. No. 2003/133930A1, registada em 24 de jan., 2003; Goldenberg, US Pub. No. 2004/219156A1, registada em 30 dez., 2002; Hariharan, US Pub. No. 2007/0009519A1, registada em 21 de jul., 2006; Curd, WO 00/067796A1, registada em 4 de maio, 2000; Kipriyanov, WO 03/088998A1, registada em 15 de abr., 2003; US 7,112,324, US 7,129,330, Olson, US Pub. No. 2004/0136908A1, registada em 4 de mar., 2004; Dorken, US Pub. No. 2006/0193852A1, registada em 5 de maio, 2006; Amphlett, US Pub. No. 2007/0009541A1, registada em 14 de set., 2006; Kersey, WO 96/36360A1, registada em 15 de maio, 1996; Kufer, WO 04/106381A1, registada em 26 de maio, 2004; Little, US Pub. No. 2007/031436A1, registada em 10 de out., 2006; Kufer, US Pub. No. 2007/123479A1, registada em 26 de maio, 2004; Baeuerle, WO 07/068354A1, registada em 29 de nov., 2006; Le Gall, EP 01314741B1, registada 14 de nov., 2001; Pesando, WO 91/13974A1, registada em 12 de mar., 1991; Allen et al, Clin. Cancer. Res 2005; 11(9) 1 de maio, 2005; Barbin et al, J. Immunother, Vol. 29, No.2, março/abril 2006; Bruenke et al, Brit. J. Haern, 130, 218-2228 (2005); Callard, J. Immunol. Vol. 148, 2983-2987, No. 10, 15 de maio, 1992; Carter et al, Immunol. Res. 2002; 26/1-3:45-54; Carter & Barrington, Curr. Dir. Autoimmun. Basel, Karger, 2004, vol. 7, pp 4-32; WWWK Cheng et al, Biochim. Biophys. Acta 1768 (2007) 21-29; Cochlovius,

Cancer Res. 60, 4336-4341, 15 de agosto, 2000; L.J.N. Cooper et al, Blood Cells, Molecules & Diseases, 33 (2004) 83-89; L.J.N. Cooper et al, Blood, 15 de fev. 2005, Vol. 105, No. 4, pp 1622-1631; Culton et al, J. Clin. Immunol., Vol. 27, No. 1, jan. 2007; Daniel et al, Blood, Vol. 92, No. 12 (15 dez.), 1998: pp 4750-4757; Doody et al, Curr. Opin. Immunol., 1996, pp 378-382; Dreier et al, Int. J. Cancer, 100, 690-697 (2002); Dreier et al, J. Immunol., 2003, pp. 4397-4402; Fearon & Carter, Annu. Rev. Immunol. 1995. 13:127-149; Fearon & Carroll, Annu. Rev. Immunol. 2000. 18:393-422; Fujimoto & Sato, J. Dermatol. Sci. (2007) em impressão; Le Gall et al, Prot. Engr, Des. & Select., vol. 17, no. 4, pp.357-366, 2004; Ghetie et al, Blood, 1 de jul 2004, Vol. 104, No. 1, pp.178-183; Ghetie et al, Blood, Vol. 83, No. 5 (Mar 1), 1994: pp 1329-1336; Ghetie et al, Clin. Cancer Res., Vol. 5, 3920-2927, Dec. 1999; Ginaldi et al, J. Clin. Pathol., 1998; 51:364-369; Grossbard et al, Clin. Cancer Res., Vol. 5, 2392-2398, set. 1999; Grossbard et al, Brit. J. Haematol., 1998, 102, 509-515; Grossbard et al, Blood, Vol. 80, No. 4 (15 de agosto), 1992: pp 863-878; Grossbard & Fidias, Clin. Immunol. & Immunopath., Vol. 76, No. 2, agosto., pp. 107-114, 1995; M. Green, Cancer Immunol. Immunother. (2004) 53: 625-632; Harata et al, Blood, 1 set. 2004, Vol. 104, No. 5, pp 1442-1449; Hekman et al, Cancer Immunol. Immunother. (1991) 32: 364-372; Hoffmann et al, Int. J. Cancer: 115, 98-104 (2005); Kipriyanov et al, J. Immunol. (2002), pp. 138-144; Kipriyanov et al, Int. J. Cancer: 77, 763-772 (1998); Kipriyanov et al, J. Immunol. Meth 196 (1996) 51-62; Lang et al, Blood, 15 maio 2004, Vol. 103, No. 10, pp 3982-3985; Lankester et al, J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 37, set. 13, pp. 22326-22330, 1996; Loeffler et al, Blood, 15 mar 2000, Vol. 95, No. 6, pp 2098-2103; Masir, et al Histopathol., 2006, 48, pps. 239-246; Bargou et al, MT103 (MEDI-538) Poster; Mitchell et al, J. Nucl. Med. 2003; 44:1106-1112; Molhoj et al, Molec.

Immunol., 44 (2007) 1935-1943; Pietersz et al, Cancer Immunol. Immunother (1995) 41: 53-60; Sapra et al, Clin. Cancer Res. Vol. 10, 1100-1111, fev. 1, 2004; Schlereth et al, Cancer Immunol. Immunother. (2006) 55: 503-514; Schwemmlein et al, Leukemia (2007) 21, 1405-1412; Sieber et al, Brit. J. Haematology, 2003, 121, 458-461; Stone et al, Blood, Vol, 88, No. 4 (agosto 15), 1996: 1188-1197; Sun et al, Molec. Immunolog. 41 (2004) 929-938; Tedder & Isaacs, J. Immunolog. Vol. 143, 712-717, No. 2 jul 15, 1989; Tedder et al, Curr. Dir. Autoimmun. Basel, Karger, 2005, vol 8, pp 55-90; Tedder et al, Springer Semin. Immun. (2006) 28: 351-364; Tiroch et al, J. Immunol., 2002, 168: 3275-3282; Uckun et al, Blood, Vol 71, No 1 (jan), 1988: pp 13-29; Uckun et al, J. Immunol., Vol 134, No 3, março 1985, pp 2010-2016; Vallera et al, Clin. Cancer Res. 2005; 11(10) maio 15, 2005; Vlasveld et al, Cancer Immunol. Immunother. (1995) 40: 37-47; Vuist et al, Cancer Res, 49, 3783-3788, julho 15, 1989; Vuis et al, Cancer Res, 50, 5767-5772, set. 15, 1990; Yan et al, Int. Immunol. Vol 17, No. 7, pp 869-877 (2005); Yazawa, et al, PNAS 2005; 102; 15178-15183. As moléculas descritas nas US 5,686,072, WO 02/080987A1 e US Pub. No. 2004/0136908A1 e identificadas como 4G7, as moléculas descritas na WO 1007/002223A2 e Tedder, são preferidas.

Os anticorpos da presente invenção podem encontrar aplicação numa vasta gama de produtos. Numa forma de realização os anticorpos da invenção são um terapêutico, um diagnóstico, ou um reagente de pesquisa, preferencialmente um terapêutico. Em alternativa, o anticorpo da presente invenção pode ser usado para usos agrícolas ou industriais. Um anticorpo da presente invenção pode encontrar aplicação numa composição de anticorpo que é monoclonal ou policlonal. Os anticorpos da presente invenção podem ser agonista, antagonistas, neutralizantes inibidores, ou

estimuladores. Numa forma de realização preferida, os anticorpos da presente invenção são usados para matar células alvo que suportam o抗igénio alvo, por exemplo células cancerígenas. Numa forma de realização alternativa, os anticorpos da presente invenção são usados para bloquear, antagonizar ou agonizar o抗igénio alvo. Numa forma de realização preferida alternativa, os anticorpos da presente invenção são usados para bloquear, antagonizar ou agonizar o抗igénio alvo e matar as células alvo que suportam o抗igénio alvo.

Anticorpos anti-CD19 como terapêuticas para tratar distúrbios das células B

Os anticorpos são uma classe de proteínas terapêuticas que podem ser usados para tratar distúrbios das células B. Um certo número das propriedades favoráveis de anticorpos, incluindo mas não limitado a especificidade para o alvo, capacidade para mediar mecanismos efetores imunitários, e longa vida no soro, torna os anticorpos terapêuticas poderosas. A presente invenção descreve anticorpos contra as células B de抗igénio CD19.

As células B de抗igénio CD19 (CD19, também conhecido como抗igénio B4 da superfície das células B, Leu-12) é um marcador de superfície de pan-célula B humana que é expressa a partir de estádios precoces de desenvolvimento da pré-célula B através de diferenciação do terminal nas células plasmáticas. O CD19 promove a proliferação e sobrevivência de células B maduras. Associa-se num complexo com CD21 na superfície celular. Também se associa com CD81 e Leu-13 e potencia a sinalização das células B recetora (RCB). Em conjunto com RCB, o CD19 modula a sinalização intrínseca e a induzida por recetor抗igénio limite

crítico para a expansão clonal de células B e imunidade humoral. Em colaboração com CD21 liga o sistema imunitário inato e adaptativo. Após a ativação, a cauda citoplasmática do CD19 torna-se fosforilada o que leva a ligação pela família das Src quinases e recrutamento da PI-3 quinase. É um alvo de imunoterapia atraente para cancros de origem linfóide uma vez que é também expresso na vasta maioria das células LNH assim como algumas leucemias.

Um certo número de anticorpos ou conjugados de anticorpos que visam CD19 foram avaliados em estudos pré-clínicos ou em ensaios clínicos para o tratamento de cancros. Estes anticorpos anti-CD19 ou conjugados de anticorpo incluem mas não são limitados a MT-103 (um anticorpo CD19/CD3 biespecífico de cadeia simples; Hoffman et al, 2005 Int J Cancer 115:98-104; Schlereth et al, 2006 Cancer Immunol Immunother 55:503-514), um diacorpo CD19/CD16 (Schlenzka et al, 2004 Anti-cancer Drugs 15:915-919; Kipriyanov et al, 2002 J Immunol 169:137-144), BU12-saporin (Flavell et al, 1995 Br J Cancer 72:1373-1379), e anti-CD19-idarubicina (Rowland et al, 1993 Cancer Immunol Immunother 55:503-514).

Otimização Fc de anticorpos anti-CD19

Há um certo número de mecanismos caracterizados através dos quais os anticorpos medeiam efeitos celulares, incluindo antiproliferação via bloqueio de vias de crescimento necessários, de sinalização intracelular conduzindo à apoptose, regulação negativa reforçada e/ou renovação dos receptores, citotoxicidade dependente do complemento (CDC), citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (CMCA), fagocitose mediada por células dependentes de anticorpo (FCDA) e promoção de uma resposta imune adaptiva (Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410). A eficácia de anticorpo

pode ser devido a uma combinação destes mecanismos, e sua importância relativa na terapia clínica para a oncologia parece ser dependente de cancro.

A importância de funções efetoras mediadas por Fc γ R para a atividade de alguns anticorpos foi demonstrada em ratinhos (Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:652-656; Clynes et al., 2000, Nat Med 6:443-446), e através de correlações observadas entre eficácia clínica em humanos e o seu alotipo de formas de alta (V158) ou baixa (F158) afinidade polimórfica de Fc γ RIIIa (Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758; Weng & Levy, 2003, Journal of Clinical Oncology, 21:3940-3947). Juntamente estes dados sugerem que um anticorpo que é otimizado para ligar a certos Fc γ Rs podem mediar melhor as funções efetoras, e deste modo destruir as células alvo mais efetivamente em doentes. Assim, um meio promissor para melhorar a potência antitumoral de anticorpos é através do aumento da sua capacidade para mediar funções efetoras citotóxicas tais como CMCA, FCDA, e CDC. Adicionalmente, os anticorpos podem mediar mecanismos anti-tumorais através da inibição de crescimento ou sinalização apoptótica que pode ocorrer quando um anticorpo se liga ao seu alvo nas células tumorais. Essa sinalização pode ser potenciada quando os anticorpos são apresentados para as células do tumor ligados a células imunitárias via Fc γ R. Portanto o aumento da afinidade dos anticorpos para Fc γ Rs pode resultar melhorias nos efeitos antiproliferativos.

A manipulação do anticorpo para optimizar a função efetora foi alcançada usando modificações de aminoácidos (ver por exemplo a US 2004/0132101 e US 2006/0024298 e referências aí citadas), e as glicoformas manipuladas (ver por exemplo Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Shinkawa et

al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473, Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnology and Bioengineering 87(5):614-621).

Modificações para otimização da função efetora

A presente divulgação é dirigida para anticorpos compreendendo modificações, em que as referidas modificações alteram a afinidade para um ou mais receptores Fc, e/ou alterar a capacidade do anticorpo para mediar uma ou mais funções efetoras. As modificações incluem modificações de aminoácido e modificações de glicoforma.

Modificações de aminoácido

Como descrito na US 2006/0024298, intitulada "Optimized Fc Variants", modificações de aminoácido em posições da cadeia pesada da região constante 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, e 337, permite a modificação das propriedades de ligação a FcγR, função efetora, e propriedades potencialmente clínicas de anticorpos.

Em particular, variantes que alteram a ligação a um ou mais receptores humanos Fc podem compreender um aminoácido 222E, 222Y, 223E, 223K, 224E, 224Y, 225E, 225K, 225W, 227E, 227G, 227K, 227Y, 228E, 228G, 228K, 228Y, 230A, 230E, 230G, 230Y, 231E, 231G, 231K, 231P, 231Y, 232E, 232G, 232K, 232Y, 233A, 233D, 233F, 233G, 233H, 233I, 233K, 233L, 233M, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233V, 233W, 233Y, 234A, 234D, 234E, 234F,

234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234P, 234Q, 234R, 234S,
234T, 234V, 234W, 234Y, 235A, 235D, 235E, 235F, 235G, 235H,
235I, 235K, 235M, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235T, 235V,
235W, 235Y, 236A, 236D, 236E, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L,
236M, 236N, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y,
237D, 237E, 237F, 237H, 237I, 237K, 237L, 237M, 237N, 237P,
237Q, 237R, 237S, 237T, 237V, 237W, 237Y, 238D, 238E, 238F,
238G, 238H, 238I, 238K, 238L, 238M, 238N, 238Q, 238R, 238S,
238T, 238V, 238W, 238Y, 239D, 239E, 239F, 239G, 239H, 239I,
239K, 239L, 239M, 239N, 239P, 239Q, 239R, 239T, 239V, 239W,
239Y, 240A, 240I, 240M, 240T, 241D, 241E, 241L, 241R, 241S,
241W, 241Y, 243E, 243H, 243L, 243Q, 243R, 243W, 243Y, 244H,
245A, 246D, 246E, 246H, 246Y, 247G, 247V, 249H, 249Q,
249Y, 255E, 255Y, 258H, 258S, 258Y, 260D, 260E, 260H, 260Y,
262A, 262E, 262F, 262I, 262T, 263A, 263I, 263M, 263T, 264A,
264D, 264E, 264F, 264G, 264H, 264I, 264K, 264L, 264M, 264N,
264P, 264Q, 264R, 264S, 264T, 264W, 264Y, 265F, 265G, 265H,
265I, 265K, 265L, 265M, 265N, 265P, 265Q, 265R, 265S, 265T,
265V, 265W, 265Y, 266A, 266I, 266M, 266T, 267D, 267E, 267F,
267H, 267I, 267K, 267L, 267M, 267N, 267P, 267Q, 267R, 267T,
267V, 267W, 267Y, 268D, 268E, 268F, 268G, 268I, 268K, 268L,
268M, 268P, 268Q, 268R, 268T, 268V, 268W, 269F, 269G, 269H,
269I, 269K, 269L, 269M, 269N, 269P, 269R, 269S, 269T, 269V,
269W, 269Y, 270F, 270G, 270H, 270I, 270L, 270M, 270P, 270Q,
270R, 270S, 270T, 270W, 270Y, 271A, 271D, 271E, 271F, 271G,
271H, 271I, 271K, 271L, 271M, 271N, 271Q, 271R, 271S, 271T,
271V, 271W, 271Y, 272D, 272F, 272G, 272H, 272I, 272K, 272L,
272M, 272P, 272R, 272S, 272T, 272V, 272W, 272Y, 273I, 274D,
274E, 274F, 274G, 274H, 274I, 274L, 274M, 274N, 274P, 274R,
274T, 274V, 274W, 274Y, 275L, 275W, 276D, 276E, 276F, 276G,
276H, 276I, 276L, 276M, 276P, 276R, 276S, 276T, 276V, 276W,
276Y, 278D, 278E, 278G, 278H, 278I, 278K, 278L, 278M, 278N,
278P, 278Q, 278R, 278S, 278T, 278V, 278W, 280G, 280K, 280L,
280P, 280W, 281D, 281E, 281K, 281N, 281P, 281Q, 281Y, 282E,
282G, 282K, 282P, 282Y, 283G, 283H, 283K, 283L, 283P, 283R,

283Y, 284D, 284E, 284L, 284N, 284Q, 284T, 284Y, 285D, 285E,
285K, 285Q, 285W, 285Y, 286E, 286G, 286P, 286Y, 288D, 288E,
288Y, 290D, 290H, 290L, 290N, 290W, 291D, 291E, 291G, 291H,
291I, 291Q, 291T, 292D, 292E, 292T, 292Y, 293F, 293G, 293H,
293I, 293L, 293M, 293N, 293P, 293R, 293S, 293T, 293V, 293W,
293Y, 294F, 294G, 294H, 294I, 294K, 294L, 294M, 294P, 294R,
294S, 294T, 294V, 294W, 294Y, 295D, 295E, 295F, 295G, 295H,
295I, 295M, 295N, 295P, 295R, 295S, 295T, 295V, 295W, 295Y,
296A, 296D, 296E, 296G, 296H, 296I, 296K, 296L, 296M, 296N,
296Q, 296R, 296S, 296T, 296V, 297D, 297E, 297F, 297G, 297H,
297I, 297K, 297L, 297M, 297P, 297Q, 297R, 297S, 297T, 297V,
297W, 297Y, 298A, 298D, 298E, 298F, 298H, 298I, 298K, 298M,
298N, 298Q, 298R, 298T, 298W, 298Y, 299A, 299D, 299E, 299F,
299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R,
299S, 299V, 299W, 299Y, 300A, 300D, 300E, 300G, 300H, 300K,
300M, 300N, 300P, 300Q, 300R, 300S, 300T, 300V, 300W, 301D,
301E, 301H, 301Y, 302I, 303D, 303E, 303Y, 304D, 304H, 304L,
304N, 304T, 305E, 305T, 305Y, 313F, 317E, 317Q, 318H, 318L,
318Q, 318R, 318Y, 320D, 320F, 320G, 320H, 320I, 320L, 320N,
320P, 320S, 320T, 320V, 320W, 320Y, 322D, 322F, 322G, 322H,
322I, 322P, 322S, 322T, 322V, 322W, 322Y, 323I, 324D, 324F,
324G, 324H, 324I, 324L, 324M, 324P, 324R, 324T, 324V, 324W,
324Y, 325A, 325D, 325E, 325F, 325G, 325H, 325I, 325K, 325L,
325M, 325P, 325Q, 325R, 325S, 325T, 325V, 325W, 325Y, 326E,
326I, 326L, 326P, 326T, 327D, 327E, 327F, 327H, 327I, 327K,
327L, 327M, 327N, 327P, 327R, 327S, 327T, 327V, 327W, 327Y,
328A, 328D, 328E, 328F, 328G, 328H, 328I, 328K, 328M, 328N,
328P, 328Q, 328R, 328S, 328T, 328V, 328W, 328Y, 329D, 329E,
329F, 329G, 329H, 329I, 329K, 329L, 329M, 329N, 329Q, 329R,
329S, 329T, 329V, 329W, 329Y, 330E, 330F, 330G, 330H, 330I,
330L, 330M, 330N, 330P, 330R, 330S, 330T, 330V, 330W, 330Y,
331D, 331F, 331H, 331I, 331L, 331M, 331Q, 331R, 331T, 331V,
331W, 331Y, 332A, 332D, 332E, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M,
332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 333A,
333F, 333H, 333I, 333L, 333M, 333P, 333T, 333Y, 334A, 334F,

334I, 334L, 334P, 334T, 335D, 335F, 335G, 335H, 335I, 335L, 335M, 335N, 335P, 335R, 335S, 335V, 335W, 335Y, 336E, 336K, 336Y, 337E, 337H, e 337N, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Como descrito na US 2005/0244403, intitulada "Immunoglobulin variants outside the Fc region", modificações de aminoácido em posições da cadeia pesada da região constante 118, 119, 120, 121, 122, 124, 126, 129, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 147, 148, 150, 151, 152, 153, 155, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 183, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, e 236, permite a modificação de propriedades de ligação a Fc γ R, a função efetora, e propriedades potencialmente clínicas de anticorpos.

Como descrito na US 2005/0244403, intitulada "Immunoglobulin variants outside the Fc region", as modificações de aminoácido nas posições da região constante de cadeia leve 108, 109, 110, 111, 112, 114, 116, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 145, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 176, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 193, 195, 197, 199, 200, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 212, 213, permite a modificação de propriedades de ligação a Fc γ R, a função efetora, e as propriedades potencialmente clínicas de anticorpos.

Em particular, as variantes que alteram a ligação a um ou mais receptores humanos Fc pode compreender uma modificação de aminoácido na região constante de cadeia pesada, como aqui descrito, selecionado a partir do grupo que consiste de 118K, 118E, 118Y, 119R, 119E, 119Y, 120R, 120E, 120I, 121E, 121Y, 121H, 122E, 122R, 124K, 124E, 124Y, 126K, 126D, 129L, 129D, 131G, 131T, 132D, 132R, 132L, 133R, 133E, 133L, 135I, 135E, 135K, 136E, 136K, 136I, 137E, 138S, 138R, 138D, 139I, 139E, 139K, 147A, 147E, 148Y, 148K, 150L, 150K, 150E, 151A, 151D, 152L, 152K, 153L, 153D, 155E, 155K, 155I, 157E, 157K, 157Y, 159K, 159D, 159L, 160K, 160E, 160Y, 161D, 162D, 162K, 162Y, 163R, 164R, 164E, 164Y, 165D, 165R, 165Y, 166D, 167A, 168L, 169E, 171G, 171H, 172K, 172L, 172E, 173T, 173D, 174E, 174K, 174Y, 175D, 175L, 176D, 176R, 176L, 177R, 177E, 177Y, 178D, 179K, 179Y, 179E, 180K, 180L, 180E, 183T, 187I, 187K, 187E, 188I, 189D, 189G, 190I, 190K, 190E, 191D, 191R, 191Y, 192N, 192R, 192L, 193F, 193E, 194R, 194D, 195R, 195D, 195Y, 196K, 196D, 196L, 197R, 197E, 197Y, 198L, 199T, 199D, 199K, 201E, 201K, 201L, 203D, 203L, 203K, 205D, 205L, 206A, 206E, 207K, 207D, 208R, 208E, 208Y, 209E, 209K, 209Y, 210L, 210E, 210Y, 211R, 211E, 211Y, 212Q, 212K, 212H, 212L, 212Y, 213N, 213E, 213H, 213L, 213Y, 214N, 214E, 214H, 214L, 214Y, 216N, 216K, 216H, 216L, 216Y, 217D, 217H, 217A, 217V, 217G, 218D, 218E, 218Q, 218T, 218H, 218L, 218Y, 219D, 219E, 219Q, 219K, 219T, 219H, 219L, 219I, 219Y, 205A, 210A, 213A, 214A, 218A, 221K, 221Y, 221E, 221N, 221Q, 221R, 221S, 221T, 221H, 221A, 221V, 221L, 221I, 221F, 221M, 221W, 221P, 221G, 222E, 222Y, 222D, 222N, 222Q, 222R, 222S, 222T, 222H, 222V, 222L, 222I, 222F, 222M, 222W, 222P, 222G, 222A, 223D, 223N, 223Q, 223R, 223S, 223H, 223A, 223V, 223L, 223I, 223F, 223M, 223Y, 223W, 223P, 223G, 223E, 223K, 224D, 224N, 224Q, 224K, 224R, 224S, 224T, 224V, 224L, 224I, 224F, 224M, 224W, 224P, 224G, 224E, 224Y, 224A, 225D, 225N, 225Q, 225R, 225S, 225H, 225A, 225V, 225L, 225I, 225F, 225M, 225Y, 225P, 225G, 225E, 225K, 225W, 226S, 227E, 227K, 227Y, 227G, 227D, 227N, 227Q, 227R,

227S, 227T, 227H, 227A, 227V, 227L, 227I, 227F, 227M, 227W, 228K, 228Y, 228G, 228D, 228N, 228Q, 228R, 228T, 228H, 228A, 228V, 228L, 228I, 228F, 228M, 228W, 229S, 230A, 230E, 230Y, 230G, 230D, 230N, 230Q, 230K, 230R, 230S, 230T, 230H, 230V, 230L, 230I, 230F, 230M, 230W, 231K, 231P, 231D, 231N, 231Q, 231R, 231S, 231T, 231H, 231V, 231L, 231I, 231F, 231M, 231W, 232E, 232K, 232Y, 232G, 232D, 232N, 232Q, 232R, 232S, 232T, 232H, 232A, 232V, 232L, 232I, 232F, 232M, 232W, 233D, 233N, 233Q, 233R, 233S, 233T, 233H, 233A, 233V, 233L, 233I, 233F, 233M, 233Y, 233W, 233G, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 234K, 234R, 234S, 234A, 234M, 234G, 235D, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 235E, 235K, 235R, 235A, 235M, 235W, 235P, 235G, 236D, 236E, 236N, 236Q, 236K, 236R, 236S, 236T, 236H, 236A, 236V, 236L, 236I, 236F, 236M, 236Y, 236W, e 236P, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

Em particular, as variantes que alteram a ligação a um ou mais receptores humanos Fc podem compreender uma modificação de aminoácido na região constante de cadeia leve, como aqui descrito, selecionados a partir do grupo que consiste de 108D, 108I, 108Q, 109D, 109P, 109R, 110E, 110I, 110K, 111E, 111K, 111L, 112E, 112R, 112Y, 114D, 114I, 114K, 116T, 121D, 122R, 122S, 122Y, 123L, 123R, 124E, 125E, 125K, 126D, 126L, 126Q, 127A, 127D, 127K, 128N, 129E, 129I, 129K, 131T, 137K, 137S, 138D, 138K, 138L, 140E, 140H, 140K, 141E, 141K, 142D, 142G, 142L, 143A, 143L, 143R, 145D, 145T, 145Y, 147A, 147E, 147K, 149D, 149Y, 150A, 151I, 151K, 152L, 152R, 152S, 153D, 153H, 153S, 154E, 154R, 154V, 155E, 155I, 155K, 156A, 156D, 156R, 157N, 158D, 158L, 158R, 159E, 159K, 159L, 160K, 160V, 161K, 161L, 162T, 163E, 163K, 163T, 164Q, 165K, 165P, 165Y, 166E, 166M, 166S, 167K, 167L, 168K, 168Q, 168Y, 169D, 169H, 169S, 170I, 170N, 170R, 171A, 171N, 171V, 172E, 172I, 172K, 173K, 173L, 173Q, 174A, 176T, 180E, 180K, 180S, 181K, 182E, 182R, 182T, 183D, 183L, 183P, 184E, 184K, 184Y, 185I, 185Q,

185R, 187K, 187Y, 188E, 188S, 188Y, 189D, 189K, 189Y, 190E, 190L, 190R, 191E, 191R, 191S, 193E, 193K, 193S, 195I, 195K, 195Q, 197E, 197K, 197L, 199E, 199K, 199Y, 200S, 202D, 202R, 202Y, 203D, 203L, 203R, 204T, 205E, 205K, 206E, 206I, 206K, 207A, 207E, 207L, 208E, 208K, 208T, 210A, 210E, 210K, 211A, 211E, 211P, 212E, 212K, 212T, 213L, 213R, em que numeração é de acordo com o índice EU.

Substituições adicionais que podem ser usadas na presente invenção incluem outras substituições que modulam a afinidade ao recetor Fc, a função efetora mediada por FcγR, e/ou a função efetora mediada por complemento, incluem mas não são limitados a 298A, 298T, 326A, 326D, 326E, 326W, 326Y, 333A, 333S, 334L, e 334A (US 6,737,056; Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604; US 6,528,624; Idusogie et al., 2001, J. Immunology 166:2571-2572), 247L, 255L, 270E, 392T, 396L, e 421K (US 2005/037000; US 2005/0064514), e 280H, 280Q, e 280Y (US 2004/0002587).

Numa outra forma de realização, os anticorpos como aqui divulgados podem ser combinados com variantes constantes de cadeia pesada que alteram a ligação FcRn. Estes incluem modificações que modificam a afinidade FcRn de um modo específico de pH. Em particular, as variantes que aumentam a ligação Fc incluem FcRn mas não são limitados a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356, US 2005/0276799, WO 2004/035752, WO 2004/092219, US 2005/0014934, US 2005/0032114, WO 2005/037867, US 2005/0226864), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604, US 2005/0118174, US 6737056, US 2006/0194291, US 2006/0194957, WO 2006/031370, US 2006/0067930), 252F, 252T,

252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, US7083784, WO 97/34631, US6821505, WO 2002/060919, US 2006/0198840), 257C, 257M, 257L, 257N, 257Y, 279E, 279Q, 279Y, inserção de Ser a seguir a 281, 283F, 284E, 306Y, 307V, 308F, 308Y 311V, 385H, 385N, (WO 2006/053301, US 2006/0173170, US 2007/0135620) 204D, 284E, 285E, 286D, e 290E (WO 2005/047327).

Os anticorpos como aqui divulgados podem compreender modificações isotípicas, que são modificações numa IgG parente com o tipo de aminoácido numa IgG alternativa. Por exemplo como ilustrado na Figura 3, uma variante IgG1/IgG3 híbrida pode ser construída por substituição das posições de IgG1 na região CH2 e/ou CH3 com os aminoácidos da IgG3 nas posições em que dois isotipos diferem. Assim pode ser construída uma variante de antícorpo IgG híbrida que compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo que consiste de: 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, e 436F. Numa outra forma de realização da invenção, uma variante híbrida IgG1/IgG2 pode ser construída pela substituição das posições IgG2 na região CH2 e/ou CH3 com aminoácidos de IgG1 nas posições onde os dois isotipos diferem. Assim pode ser construída uma variante de antícorpo IgG híbrido que compreende uma ou mais modificações selecionadas a partir do grupo que consiste de 233E, 234L, 235L, -236G (referente a uma inserção de uma glicina na posição 236), e 327A.

Modificações de Glicoformas

Muitos polipeptídos, incluindo anticorpos, são submetidos a uma diversidade de modificações pós translacionais

envolvendo as porções hidrato de carbono, tais como a glicosilação com oligossacáridos. Existem vários fatores que podem influenciar a glicosilação. As espécies, tipos de tecidos e células têm, todos, mostrado ser importantes do mesmo modo a que glicosilação ocorre. Além disso, o envolvimento extracelular, através de condições de cultura alteradas tais como concentração de soro, pode ter um efeito direto na glicosilação. (Lifely et al., 1995, Glycobiology 5(8): 813-822).

Todos os anticorpos contêm hidrato de carbono em posições conservadas nas regiões constantes da cadeia pesada. Cada isotipo de antícorpo tem uma variedade de distintas estruturas hidrato de carbono ligado a N. Para além do hidrato de carbono ligado à cadeia pesada, até 30% de IgGs humanas têm uma região Fab glicosilada. A IgG tem um único hidrato de carbono biantena ligado a N no Asn297 do domínio CH2. Para IgG a partir de soro ou produzida ex vivo em hibridomas ou células manipuladas, as IgG são heterogéneas em relação ao hidrato de carbono ligado a Asn297 (Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163: 59-76; Wright et al., 1997, Trends Biotech 15:26-32). Para IgG humana, o núcleo oligossacárido normalmente consiste em GlcNAc2Man3GlcNAc, com números diferindo de resíduos externos.

As porções hidrato de carbono da presente invenção serão descritas relativamente à nomenclatura comumente usada para a descrição de oligossacáridos. Uma revisão da química do hidrato de carbono que usa esta nomenclatura é encontrada em Hubbard et al. 1981, Ann. Rev. Biochem. 50:555-583. Esta nomenclatura inclui, por exemplo, Man, que representa manose; GlcNAc, que representa manose 2-N-acetylglucosamina; Gal que representa manose galactose; Fuc para fucose; e Glc, que representa manose glucose. Os ácidos siálicos são descritos pela notação abreviada

NeuNAc, para o ácido 5-N-acetilneurâmico, e NeuNGc para 5-glicolilneuramínico.

O termo "glicosilação" significa a ligação de oligossacáridos (hidratos de carbono contendo dois ou mais açúcares simples ligados conjuntamente por exemplo desde dois até cerca de doze açúcares simples unidos conjuntamente) a uma glicoproteína. As cadeias laterais do oligossacárido estão tipicamente ligadas à estrutura da glicoproteína através de ligações N ou O. Os oligossacáridos da presente invenção que ocorrem geralmente estão ligados a um domínio CH2 de uma região Fc como oligossacáridos ligados a N. A "glicosilação ligada a N" refere-se à ligação da porção hidrato de carbono a um resíduo de asparagina numa cadeia de glicoproteína. O especialista na técnica reconhecerá que, por exemplo, cada um dos domínios CH2 das IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de murino assim como das IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanas tem um único sítio para a glicosilação ligada a N no resíduo de aminoácido 297 (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

Para os presentes fins, uma "estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro" refere-se a uma estrutura de hidrato de carbono de núcleo processado ligado a uma região Fc a qual geralmente consiste da seguinte estrutura de hidrato de carbono GlcNAc(Fucose)-Glc-NAc-Man-(Man-GlcNAc)₂ típica dos oligossacáridos biantena. A estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro é ligada à região Fc da glicoproteína, geralmente através de ligação N a Asn297 de um domínio CH2 da região Fc. Um "GlcNAc de biseção" é um resíduo GlcNAc ligado à β 1,4 manose da estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro. O GlcNAc de biseção pode estar ligado enzimaticamente à estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro por uma enzima β (1,4)-N-

acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII). As células OHC normalmente não expressam GnTIII (Stanley et al., 1984, J. Biol. Chem. 261: 13370-13378), mas podem ser modificadas nesse sentido (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180).

A presente invenção contempla anticorpos que compreendem glicoformas modificadas ou glicoformas manipuladas. Por "glicoforma modificada" ou "glicoforma manipulada" como aqui usado entende-se uma composição hidrato de carbono que está ligada covalentemente a uma proteína, por exemplo um anticorpo, em que a referida composição hidrato de carbono difere quimicamente daquela da proteína parente. As glicoformas manipuladas podem ser úteis para vários fins, incluindo mas não limitado a aumentar ou reduzir a função efetora medida por Fc γ R. Os anticorpos aqui divulgados podem ser modificados para controlar o nível de oligossacáridos fucosilados e/ou de biseção que estão ligados covalentemente à região Fc.

Historicamente, os anticorpos produzidos em Células de Ovário de Hamster Chinês (OHC), um dos hospedeiros industriais mais usados, contêm cerca de 2 até 6% da população que é não fucosilada. A linha de células YB2/0 (mieloma de rato) e Lec13 (uma lectina mutante da linha OHC que tem uma GDP-manose 4,6 desidratase deficiente conduzindo à deficiência da GDPfucose ou intermediários açúcar GDP que são o substrato da α 1,6-fucosiltransferase (Ripka et al., 1986), no entanto, pode produzir anticorpos com 78% até 98% espécies não fucosiladas. Infelizmente, a produção de anticorpo a partir destas células é extremamente pobre e portanto estas linhas de células não são úteis para fazer comercialmente produtos de anticorpos terapêuticos. O gene FUT8 codifica a enzima α 1,6-fucosiltransferase que catalisa a transferência de um

resíduo fucosil da GDP-fucose para a posição 6 de GlcNAc ligado a Asn (ligado a N) de uma N-glicana (Yanagidani et al., 1997, J Biochem 121:626-632). Sabe-se que a α 1,6 fucosiltransferase é a única enzima responsável pela adição da fucose ao hidrato de carbono biantena ligado a N na Asn297 no domínio CH2 do anticorpo IgG.

São conhecidos vários métodos na técnica para gerar glicoformas modificadas (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem. 278:3466-3473); (US 6,602,684; US 2003/0157108; US 2003/0003097; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnology and Bioengineering 87(5):614-621; (Potelligent™ technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAb™ glycosilation engineering technology [GLYCART biotechnology AG, Zürich, Switzerland]). Estas técnicas controlam o nível de oligossacáridos fucosilados e/ou de biseção que estão ligados covalentemente à região Fc, por exemplo por expressão de uma IgG em vários organismos ou linhas de células, por manipulação ou de outro modo (por exemplo células Lec-13 OHC ou células de hibridoma rato YB2/0), por regulação enzimática envolvida no passo de glicosilação (por exemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferase] e/ou β 1-4-N-acetylglucosaminiltransferase III [GnTIII]), ou por modificação do(s) hidrato de carbono(s) após a IgG ter sido expressa.

Outros métodos para modificar as glicoformas dos anticorpos da invenção incluem o uso de estirpes de leveduras glicomanipuladas (Li et al., 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), musgo (Nechansky et al., 2007, Mol Immunol 44(7): 1826-8), e plantas (Cox et al., 2006, Nat Biotechnol

24(12):1591-7). Métodos para modificar glicoformas incluem mas não são limitados ao uso de uma estirpe glicomanipulada da levedura *Pichia pastoris* (Li et al., 2006, *Nature Biotechnology* 24(2):210-215), uma estirpe glicomanipulada do musgo *Physcomitrella patens* em que as enzimas β 1,2-xilosiltransferase e/ou α 1,3-fucosiltransferase são eliminadas (Nechansky et al., 2007, *Mol Immunol* 44(7):1826-8), e o uso de interferência de RNA para inibir alfa-1,3-fucosiltransferase e/ou beta-1,2-xilosiltransferase endógenas na planta aquática *Lemna minor* (Cox et al., 2006, *Nat Biotechnol* 24(12):1591-7).

Glicoforma modificada ou manipulada tipicamente refere-se ao hidrato de carbono ou oligossacárido diferente; assim por exemplo um anticorpo pode compreender uma glicoforma manipulada. Em alternativa, a glicoforma manipulada pode referir-se ao anticorpo que compreende o hidrato de carbono ou oligossacárido diferente. Para os fins das glicoformas modificadas aqui descritas, um "anticorpo parente" é um anticorpo glicosilado com a mesma sequência de aminoácidos e estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro como uma glicoforma manipulada da presente invenção, exceto que a fucose está ligada à estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro do anticorpo parente. Por exemplo, numa composição compreendendo a parente glicoproteína cerca de 50-100% ou cerca de 70-100% da glicoproteína parente compreendem a estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro com a fucose a ele ligada.

A presente divulgação fornece uma composição compreendendo um anticorpo glicosilado com uma região Fc, em que cerca de 51-100% do anticorpo glicosilado na composição compreende uma estrutura hidrato de carbono de núcleo maduro na qual falta fucose, ligada à região Fc do anticorpo. Mais preferencialmente, cerca de 80-100% do anticorpo na

composição comprehende a estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro que não possui fucose e o mais preferencialmente, cerca de 90-99% do anticorpo na composição não tem fucose ligada à estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro. Numa forma de realização mais preferida o anticorpo na composição comprehende tanto uma estrutura de hidrato de carbono de núcleo maduro que não possui fucose como adicionalmente comprehende pelo menos uma modificação de aminoácido na região Fc. Na forma de realização a mais preferida, a combinação da glicoforma manipulada e as modificações de aminoácido fornecem ótimas propriedades de ligação do recetor Fc ao anticorpo.

Propriedades otimizadas de anticorpos

A presente divulgação fornece variantes de anticorpo que são otimizadas para um número de propriedades terapeuticamente relevantes. Um anticorpo variante comprehende uma ou mais modificações de aminoácido em relação a um anticorpo parente, em que a(s) referida(s) modificação(ões) de aminoácido(s) fornecem uma ou mais propriedades otimizadas. Portanto os anticorpos da presente divulgação são anticorpos variantes. Um anticorpo da presente divulgação difere na sequência de aminoácidos do seu anticorpo parente devido a pelo menos uma modificação de aminoácido. Assim os anticorpos variantes da presente divulgação têm pelo menos uma modificação de aminoácido comparada com o parente. Em alternativa, os anticorpos variantes da presente divulgação podem ter mais que uma modificação de aminoácido em comparação com o parente, por exemplo desde cerca de uma até cinquenta modificações de aminoácido, preferencialmente desde cerca de uma até dez modificações de aminoácido, e mais preferencialmente desde cerca de uma até cerca de cinco modificações de aminoácido em comparação com o parente. Assim as sequências dos

anticorpos variantes e as dos anticorpos parentes são substancialmente homólogos. Por exemplo, as sequências de anticorpo variante aqui possuirão cerca de 80% de homologia com a sequência de anticorpo parente, preferencialmente pelo menos cerca de 90% de homologia, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% de homologia.

Numa forma de realização mais preferida os anticorpos da presente invenção compreendem modificações de aminoácido que fornecem propriedades de função efetora otimizadas em relação ao parente. As substituições e as propriedades de função efetora otimizada são descritas nas US 2004/0132101, WO 2004/029207, e US 2005/0054832. As propriedades que podem ser otimizadas incluem mas não são limitadas a afinidade aumentada ou reduzida para um Fc γ R. Os anticorpos como aqui divulgados são otimizados para possuir afinidade aumentada para um ativador Fc γ R humano, preferencialmente Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, e Fc γ RIIIb, o mais preferencialmente Fc γ RIIIa. Os anticorpos aqui divulgados podem ser otimizados para possuir reduzida afinidade para o recetor inibitório Fc γ RIIb humano. Estes anticorpos com propriedades terapêuticas melhoradas em humanos, por exemplo função efetora melhorada e maior potência anti-tumor. Os anticorpos aqui divulgados podem ser otimizados para terem afinidade reduzida ou ablacionada para um Fc γ R humano, incluindo mas não limitado a Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa, e Fc γ RIIIb. É previsível que estes anticorpos forneçam propriedades terapêuticas melhoradas em humanos, por exemplo reduzida função efetora e reduzida toxicidade. Os anticorpos como aqui divulgados podem fornecer afinidade aumentada para uma ou mais Fc γ Rs, ainda afinidade reduzida para um ou mais de outros Fc γ Rs. Por exemplo, um anticorpo pode ter ligação melhorada a Fc γ RIIIa, ainda uma ligação reduzida a Fc γ RIIb. Como alternativa, um anticorpo pode ter ligação melhorada a

Fc γ RIIa e Fc γ RI, embora uma ligação reduzida a Fc γ RIIb. Um anticorpo pode ter afinidade aumentada para Fc γ RIIb, embora uma afinidade reduzida a um ou mais ativadores Fc γ Rs.

A modificação preferencialmente aumenta a afinidade de ligação para um ou mais Fc γ Rs. Por "maior afinidade" ou "afinidade melhorada" ou "afinidade aumentada" ou "melhor afinidade" que uma imunoglobulina parente, como aqui usado entende-se que uma variante Fc se liga a um recetor Fc com uma constante de equilíbrio de associação (KA) significativamente mais elevada ou uma constante de equilíbrio de dissociação (KD) mais baixa que o polipéptido parente quando as quantidades do polipéptido variante e parente no ensaio de ligação são essencialmente a mesma. Por exemplo, a variante Fc com afinidade de ligação Fc γ R melhorada pode apresentar desde cerca de 5 vezes até cerca de 1000 vezes, por exemplo desde cerca de 10 vezes até cerca de 500 vezes de melhoria de afinidade de ligação ao recetor Fc em comparação com o polipéptido parente, onde a afinidade de ligação do recetor Fc é determinada, por exemplo, como divulgado aqui nos Exemplos. Consequentemente, por "afinidade reduzida" em comparação com um polipéptido Fc parente como aqui usado entende-se que uma variante Fc liga um recetor Fc com KA significativamente mais baixa ou KD mais alta que o polipéptido parente.

Os dados no presente estudo indicam que WT IgG1 humano se liga a V158 Fc γ RIIa humano com uma afinidade de aproximadamente 240 nM (Exemplo 1). Isto é consistente com a literatura que indica que esta ligação é de aproximadamente 200-500 nM, como determinado por Biacore (210 nM como mostrado em Okazaki et al, 2004, J Mol Bio 336:1239-49; 250 nM como mostrado em Lazar et al, Proc Natl Acad Sci USA 103(11):4005-4010) e calorimetria (530 nM,

Okazaki et al, 2004, J Mol Bio 336:1239-49). No entanto uma afinidade tão baixa como 750 nM foi medida num estudo (Ferrara et al., 2006, J Biol Chem 281 (8):5032-5036). Apesar de a ligação a F158 Fc γ RIIIa ser mais baixa do que o ponto de corte 5 μ M aplicado no presente estudo, a literatura indica que WT IgG1 humana se liga a F158 Fc γ RITIa humano com uma afinidade de aproximadamente 3-5 μ M, como indicado por calorimetria (2,7 μ M, em Okazaki et al, 2004, J Mol Bio 336:1239-49) e Biacore (5,0 μ M, Ferrara et al., 2006, J Biol Chem 281(8):5032-5036).

Aqui divulgada é também a otimização de ligação Fc a um Fc γ R humano, no entanto os anticorpos como aqui divulgados podem possuir afinidade aumentada ou reduzida para Fc γ Rs de organismos não humanos, incluindo mas não limitado a roedores e primatas não humanos. Os anticorpos que são otimizados para ligação a um Fc γ R não humano podem encontrar utilização em experiências. Por exemplo, estão disponíveis modelos de ratinho para uma diversidade de doenças que permitem testar propriedades como a eficácia, toxicidade, e farmacocinética de um dado fármaco candidato. Como é conhecido na técnica, as células cancerígenas podem ser enxertadas ou injetadas em ratinhos mimetizando um cancro humano, um processo referido como xeno enxertos. Testes de anticorpos que compreendem anticorpos que são otimizados para um ou mais Fc γ Rs de ratinho, podem fornecer informação valiosa com vista à eficácia da proteína, o seu mecanismo de ação, e afins. Os anticorpos aqui divulgados pode também ser otimizados para aumentar a funcionalidade e/ou propriedade de solução na forma aglicosilada. Os anticorpos glicosilados aqui divulgados podem ligar um ligando Fc com maior afinidade que a forma aglicosilada do anticorpo parente. Os referidos ligandos Fc incluem mas não são limitados a Fc γ Rs, C1q, FcRn, e proteínas A e G, e pode

ser a partir de qualquer fonte incluindo mas não limitado a humanos, ratinhos, ratos, coelhos, ou macacos, preferencialmente humanos. Os anticorpos aqui divulgados podem também ser otimizados para serem mais estáveis e/ou mais solúveis que a forma aglicosilada do anticorpo parente.

Os anticorpos aqui divulgados podem compreender modificações que modulam a interação com outros ligandos Fc que não os Fc γ Rs, incluindo mas não limitado a proteínas de complemento, FcRn, e homólogos de recetor Fc (FcRHs). FcRHs incluem mas não são limitados a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, e FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Preferencialmente, a especificidade do anticorpo para o ligando Fc da presente invenção irá determinar a sua utilidade terapêutica. A utilidade de um dado anticorpo para fins terapêuticos irá depender do epitopo ou forma ou o抗ígenio alvo e a doença ou indicação a ser tratada. Para alguns alvos e indicações, funções efetoras aumentadas mediadas por Fc γ R podem ser preferidas. Isto pode ser particularmente favorável para anticorpos anticancro. Assim podem ser usados anticorpos que compreende anticorpos que fornecem afinidade aumentada para ativar Fc γ Rs e/ou afinidade para reduzir Fc γ Rs inibidor. Para alguns alvos e indicações, pode ser também benéfico utilizar anticorpos que fornecem seletividade diferencial para diferentes ativadores Fc γ Rs; por exemplo, em alguns casos pode ser desejada ligação aumentada a Fc γ RIIa e Fc γ RIIIa, mas não a Fc γ RI, enquanto noutros casos, a ligação aumentada somente para Fc γ RIIa pode ser preferida. Para certos alvos e indicações, pode ser preferível utilizar anticorpos que aumentam tanto as funções efetoras mediadas por Fc γ R e mediadas por complemento, enquanto para outros casos pode

ser vantajoso utilizar anticorpos que aumentam as funções efetoras mediadas por Fc γ R ou mediada por complemento. Para alguns alvos ou indicações de cancro, pode ser vantajoso para reduzir ou eliminar a uma ou mais funções efetoras, por exemplo eliminando a ligação a C1q, um ou mais Fc γ R's, FcRn, ou um ou mais outros ligandos Fc. Para outros alvos e indicações, pode ser preferível utilizar anticorpos que fornecem ligação aumentada a Fc γ RIIb inibitório, ainda nível WT, reduzido, ou eliminando a ligação a ativadores Fc γ Rs. Isto pode ser particularmente útil, por exemplo, quando o objetivo de um anticorpo é inibir a inflamação ou doença autoimune, ou modulam o sistema imunitário em alguns modos.

Claramente um importante parâmetro que determina a seletividade mais benéfica de um dado anticorpo para tratar uma dada doença é o contexto do anticorpo, em que o tipo de anticorpo está a ser usado. Portanto a seletividade ou especificidade do ligando Fc de um dado anticorpo irá proporcionar propriedades diferentes dependendo de se compõe um anticorpo ou anticorpos com uma fusão acoplada ou parceiro conjugado. Por exemplo, toxina, radionucleótido, ou outros conjugados podem ser menos tóxicos para células normais se o anticorpo que os comprehende tem ligação reduzida ou eliminada de um ou mais ligandos Fc. Como outro exemplo, a fim de inibir a inflamação ou doença autoimune, pode ser preferível utilizar um anticorpo com afinidade aumentada para ativar Fc γ Rs, tais como para ligar estes Fc γ Rs e prevenir a sua ativação. Por outro lado, um anticorpo que comprehende duas ou mais regiões Fcs com afinidade Fc γ RIIb aumentada pode coenvolver este recetor na superfície das células imunitárias, inibindo deste modo a proliferação destas células. Se em alguns casos um anticorpo pode envolver o seu antigénio alvo num tipo de célula no entanto envolver Fc γ Rs em células separadas do

antigénio alvo, noutros casos pode ser vantajoso envolver Fc γ Rs na superfície das mesmas células como o antigénio alvo. Por exemplo, se os anticorpos alvo um antigénio numa célula que também expressa um ou mais Fc γ Rs, pode ser benéfico utilizar um anticorpo que aumenta ou reduz a ligação a Fc γ Rs na superfície dessa célula. Isto pode ser o caso, por exemplo quando o anticorpo está a ser utilizado como um agente anti-cancro, e coenvolvimento do antigénio alvo e Fc γ R na superfície da mesma célula promove eventos de sinalização dentro da célula que resulta na inibição do crescimento, apoptose, ou outro efeito anti-proliferativo. Em alternativa, o coenvolvimento do antigénio e do Fc γ R na mesma célula pode ser vantajoso quando o anticorpo está a ser usado para modular o sistema imunitário de vários modos, em que o coenvolvimento do antigénio alvo e Fc γ R fornece algum efeito proliferativo ou anti-proliferativo. Do mesmo modo, os anticorpos que compreende duas ou mais regiões Fc pode beneficiar dos anticorpos que modulam a seletividade ou especificidade Fc γ R para envolver Fc γ Rs na superfície da mesma célula.

A especificidade do ligando Fc dos anticorpos aqui divulgados pode ser modulada para criar diferentes perfis de função efetora que podem ser adequados para epitopos de antigénios específicos, indicações ou populações de doentes. A Figura 5 descreve várias formas de realização preferidas dos perfis de ligação ao recetor que incluem melhorias de, reduções de ou sem efeito para a ligação a vários receptores, onde tais alterações podem ser benéficas em determinados contextos. Os perfis de ligação ao recetor na Figura 5 podem variar no grau de aumento ou diminuição dos receptores específicos. Adicionalmente, as alterações de ligação podem ser especificadas no contexto de alterações adicionais de ligação a outros receptores tais como C1q ou FcRn, por exemplo através da combinação com a eliminação de

ligação a C1q para desligar a ativação do complemento, ou através da combinação de ligação aumentada C1q para aumentar a ativação do complemento. São possíveis outras formas de realização com outro perfil de ligação a recetor, os perfis de ligação a recetores enumerados são exemplificativos.

A presença de diferentes formas polimorfas de Fc γ Rs fornece no entanto outro parâmetro que afeta a utilidade terapêutica dos anticorpos aqui divulgados. Considerando que a especificidade e seletividade de um dado anticorpo para as diferentes classes de Fc γ Rs afeta significativamente a capacidade de um anticorpo para atingir o抗原 para o tratamento de uma dada doença, a especificidade ou seletividade de um anticorpo para diferentes formas polimorfas destes recetores pode em parte determinar qual a investigação ou experiências pré-clínicas que podem ser apropriados para testar, e em última análise, quais as populações de doentes que podem ou não responder ao tratamento. Assim a especificidade ou seletividade de anticorpos aqui divulgados para polimorfismo de ligando Fc, incluindo mas não limitado a polimorfismos Fc γ R, C1q, FcRn, e FcRH, pode ser usado para guiar a seleção de investigação válida e experiências pré-clínicas, definição de ensaios clínicos, seleção de doentes, dependência de dosagem, e/ou outros aspectos relativos aos ensaios clínicos.

Outras modificações

Os anticorpos como aqui divulgados podem compreender uma ou mais modificações que fornecem propriedades otimizadas que não são especificamente relacionadas com a função efetora per se. As referidas modificações podem ser modificações de aminoácido, ou podem ser modificações que são feitas enzimaticamente ou quimicamente. Tal modificação (ões)

fornecem igualmente alguma melhoria no anticorpo, por exemplo um aumento na sua estabilidade, solubilidade, função, ou uso clínico. É aqui divulgada as várias melhorias admissíveis que podem ser ligadas aos anticorpos da presente invenção com modificações adicionais.

A região variável de um anticorpo como aqui divulgado pode ser afinidade amadurecida, isto é dizer que as modificações de aminoácido têm sido feitas nos domínios VH e/ou VL do anticorpo para aumentar a ligação do anticorpo ao seu抗原 alvo. Esses tipos de modificações podem melhorar as cinéticas de associação e/ou de dissociação de ligação ao抗原 alvo. Outras modificações incluem as que melhoram a seletividade para o抗原 alvo vs. alvos alternativos. Estas incluem modificações que melhoram a seletividade para抗原 expressas no alvo vs. células não alvo. Outras melhorias para as propriedades de reconhecimento do alvo podem ser fornecidas por modificações adicionais. Tais propriedades podem incluir, mas não são limitados a, propriedades cinéticas específicas (i.e. cinéticas de associação e dissociação), seletivamente para o alvo específico em relação alvos alternativos, e seletividade para uma forma específica de alvo em relação a formas alternativas. Exemplos incluem variantes de comprimento total versus junção, da superfície celular versus formas solúveis, seletividade para diferentes variantes polimórficas, ou seletividade para formas específicas conformacionais do抗原 alvo.

Os anticorpos aqui divulgados podem compreender uma ou mais modificações que fornecem internalização reduzida ou aumentada, de um anticorpo. Os anticorpos aqui divulgados podem ser utilizados ou combinados com modificações adicionais com vista a reduzir a internalização celular de um anticorpo que ocorre através da interação com um ou mais

ligandos Fc. Deve ser esperado que esta propriedade aumente a função efetora, e, potencialmente reduza a imunogenicidade dos anticorpos. Em alternativa, os anticorpos podem ser utilizados diretamente ou em combinação com modificações adicionais com vista a aumentar a internalização celular de um anticorpo que ocorre através da interação com um ou mais ligandos Fc. Por exemplo, é usado um anticorpo que fornece ligação aumentada a Fc γ RI, que é expresso nas células dendríticas e precocemente ativo na resposta imunológica. Esta estratégia pode ser melhorada adicionalmente por combinação com modificações adicionais, tanto dentro do anticorpo ou numa ligação de fusão ou parceiro conjugado, que promove o reconhecimento e apresentação de fragmentos de péptidos Fc por moléculas MHC. Espera-se que essas estratégias devem melhorar o processamento do抗原 alvo e, assim, melhorar a antigenicidade do抗原 alvo (Bonnerot and Amigorena, 1999, Immunol Rev. 172:279-84), promover uma resposta imune adaptativa e maior mortalidade da célula alvo pelo sistema imunitário humano. Estas estratégias podem ser particularmente vantajosas quando o抗原 alvo é libertado da superfície celular. Uma aplicação adicional destes conceitos surge com imunoterapias de vacina idiotípica, nas quais os anticorpos específicos para clone produzidos pelas células do linfoma dos doentes são usados para vacinar o doente.

As modificações podem ser feitas para melhorar as propriedades biofísicas dos anticorpos, incluindo mas não limitado a estabilidade, solubilidade, e estado oligomérico. As modificações podem incluir, por exemplo, substituições que fornecem mais interações intramoleculares favoráveis no anticorpo tais como para fornecer maior estabilidade, ou substituição de aminoácidos não polares expostos com aminoácido polar de maior solubilidade. Um

certo número de objetivos e métodos de otimização são descritos na US 2004/0110226, que podem encontrar uso para aplicar modificações adicionais para otimizar adicionalmente os anticorpos aqui divulgados. Os anticorpos aqui divulgados podem também ser combinados com modificações adicionais que reduzem o estado oligomérico ou tamanho, de modo a que a penetração no tumor seja aumentado, ou As taxas de depuração *in vivo* são aumentadas como desejado.

Outras modificações dos anticorpos aqui divulgados incluem aqueles que permitem a formação específica ou moléculas homodiméricas ou homomultiméricas. Essas modificações incluem mas não são limitadas uns dissulfetos manipulados, assim como modificações químicas ou métodos de agregação que podem proporcionar um mecanismo para gerar homodimérico ou homomultímeros covalentes. Por exemplo, métodos de manipulação e composições dessas moléculas são descritos em Kan et al., 2001, *J. Immunol.*, 2001, 166: 1320-1326; Stevenson et al., 2002, *Recent Results Cancer Res.* 159: 104-12; US 5,681,566; Caron et al., 1992, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195, e Shope, 1992, *J. Immunol.* 148(9):2918-22. Modificações adicionais às variantes aqui divulgadas incluem aquelas que permitem a formação específica ou heterodimérica, heteromultimérica, bifuncional, e/ou moléculas multifuncionais. Essas modificações incluem, mas não são limitados a, uma ou mais substituições de aminoácidos no domínio CH3, no qual as substituições reduzem a formação de homodímero e aumentam a formação de heterodímero. Por exemplo, métodos de manipulação e composições dessas moléculas são descritos em Atwell et al., 1997, *J. Mol. Biol.* 270(1): 26-35, e Carler et al., 2001, *J. Immunol. Methods* 248:7-15. Modificações adicionais incluem modificações na articulação e domínios CH3, nos

quais as modificações reduzem a tendência para formar dímeros.

Os anticorpos aqui divulgados podem compreender modificações que removem sítios de degradação proteolítica. Estes podem incluir, por exemplo, sítios de protease que reduzem o rendimento de produção, assim como sítios de protease que degradam a proteína administrada *in vivo*. São feitas modificações adicionais para remover sítios de degradação covalentes tais como sítios de desaminação (i.e. desaminação de resíduos de glutaminilo e asparaginilo nos correspondentes resíduos de glutamilo e aspartilo), oxidação, e degradação proteolítica. Os sítios de desaminação que são particularmente úteis remover são aqueles que têm maior propensão para a desaminação, incluindo, mas não limitado a resíduos de asparaginilo e glutamilo seguidos por glicinas (motivos NG e QG, respectivamente). Nesses casos, a substituição de qualquer resíduo pode reduzir significativamente a tendência para a desaminação. Sítios comuns de oxidação incluem resíduos de metionina e cisteína. Outras modificações covalentes, que podem ser tanto introduzidas como removidas, incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos de serilo ou treonilo, metilação de "-grupos amina de cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilação das aminas N-terminais, e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal. Modificações adicionais podem também incluir mas não são limitadas a modificações pós-translacionais tais como glicosilação e fosforilação ligada a N ou ligada a O.

As modificações podem incluir aquelas que melhoram a expressão e/ou os rendimentos de purificação a partir de

hospedeiros ou células hospedeiras comumente usadas para a produção de biologias. Estas incluem, mas não são limitadas a várias linhas de células de mamíferos (por exemplo OHC), linhas de células de leveduras, linhas de células bacterianas, e plantas. As modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a capacidade das cadeias pesadas formarem ligações dissulfeto intercadeia. As modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a capacidade das cadeias pesadas para formar ligações dissulfeto intracadeia.

Os anticorpos como aqui usados podem compreender modificações que incluem o uso de aminoácidos não naturais incorporados usando, por exemplo, as tecnologias desenvolvidas por Schultz e colegas, incluindo mas não limitado aos métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, e Chin et al., 2003, Science 341(5635):964-7. Estas modificações podem adicionalmente permitir a manipulação de várias propriedades funcionais, biofísicas, imunológicas, ou as propriedades de produção discutidas acima. Estas modificações permitem ainda modificações químicas adicionais para outros fins. Outras modificações são aqui divulgadas. Por exemplo, o antícorpo pode ser ligado a uma diversidade de polímeros não proteicos, por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. Modificações de aminoácidos adicionais podem ser feitas para permitir modificação química postranslacional específica ou não específica ou dos anticorpos. Tais modificações, incluem, mas não são limitadas a PEGilação e glicosilação. Substituições específicas que podem ser utilizadas para permitir a PEGilação incluem, mas não são limitadas a,

introdução de novos resíduos de cisteína ou aminoácidos não naturais de modo a que químicas de acoplamento eficientes e específicas possam ser usadas para ligar um PEG ou de outra forma uma porção polimérica. A introdução de sítios de glicosilação específicos pode ser obtida por introdução de novas sequências N-X-T/S nos anticorpos da presente invenção.

Modificações covalentes de anticorpos são divulgadas, e são geralmente, mas não sempre, feitas postranslacionalmente. Por exemplo, vários tipos de modificações covalentes do antícorpo são introduzidos numa molécula reagindo o resíduo de aminoácidos específico do antícorpo com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos N- ou C-terminais.

Em algumas formas de realização, a modificação covalente dos anticorpos aqui divulgadas compreendem a adição de um ou mais marcadores. O termo "grupo marcador" significa qualquer marcador detetável. O grupo marcador pode ser ligado ao antícorpo por meio de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir impedimento estérico potencial. São conhecidos na técnica vários métodos para proteínas de marcação e podem ser usados. Em geral, os marcadores caem uma variedade de classes, dependendo do ensaio no qual são para ser detetados: a) marcadores isotópicos, que podem ser radioativos ou isótopos pesados; b) marcadores magnéticos (por exemplo, partículas magnéticas); c) porções ativas redox; d) corantes óticos; grupos enzimáticos (por exemplo peroxidase de rabano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina); e) grupos biotinilados; e f) epitopos de polipeptídos pré-determinados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências pares zipper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de

metais, marcadores de epitopo, etc.). O grupo marcador deve ser ligado ao anticorpo por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial. Vários métodos para marcação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Marcadores específicos incluem corantes óticos, incluindo, mas não limitado a, cromóforos, fósforos e fluoróforos, sendo os últimos específicos em muitos casos. Os fluoróforos podem ser ou "pequena molécula" flúores, ou flúores proteicos. Por "marcador fluorescente" entende-se qualquer molécula que pode ser detetada através das suas inerentes propriedades fluorescentes.

Conjugados e fusões de anticorpo

Os anticorpos aqui divulgados podem ser "proteínas de fusão" de anticorpo, algumas vezes referidas aqui como "conjugados de anticorpo". O parceiro de fusão ou parceiro conjugado pode ser proteico ou não proteico; o último sendo geralmente gerado usando grupos funcionais no anticorpo e no parceiro conjugado. Os parceiros de fusão e conjugados podem ser qualquer molécula, incluindo compostos químicos de moléculas pequenas e polipeptídios. Por exemplo, vários conjugados de anticorpo e métodos são descritos em Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588. Possíveis parceiros conjugados incluem mas não são limitados a citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agente quimioterapêutico, agentes antiangiogénicos, inibidores da tirosina quinase, e outros agentes terapeuticamente ativos. Em alguns casos os parceiros conjugados podem ser pensados mais como cargas úteis, quer dizer que o objetivo de um conjugado é direcionado a entrega do parceiro conjugado à célula alvo, por exemplo uma célula de cancro ou célula imune, pelo anticorpo. Assim, por exemplo, a conjugação de uma toxina a um

anticorpo visa a aplicação da referida toxina a células expressando o抗原 alvo. Como será apreciado por um especialista na técnica, na realidade os conceitos e definições de fusão e conjugado são sobreposição. A designação de um anticorpo como uma fusão ou conjugado não é para o limitar a qualquer forma de realização particular aqui divulgada. Pelo contrário, estes termos são usados vagamente para transmitir o conceito amplo de que qualquer anticorpo como aqui divulgado pode estar geneticamente, quimicamente, ou de outro modo ligado, a um ou mais polipeptídos ou moléculas para dar alguma propriedade desejada.

Conjugados adequados incluem, mas não são limitados a, marcadores como descrito a seguir, fármacos e agentes citotóxicos incluindo, mas não limitado a, fármacos citotóxicos (por exemplo, agentes quimioterapêuticos) ou toxinas ou fragmentos ativos dessas toxinas. Toxinas adequadas e os seus correspondentes fragmentos incluem cadeia A difteria, cadeia A exotoxina, cadeia A rícino, cadeia A abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina e semelhantes. Os agentes citotóxicos incluem também radioquímicos obtidos por conjugação de radioisótopos aos anticorpos, ou ligação de um radionuclídeo a um agente quelante que tenha sido ligado covalentemente ao anticorpo. Formas de realização adicionais utilizam caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina, e duocarmicinas e análogos; para estes últimos, ver U.S. 2003/0050331.

Os anticorpos com0maqui divulgados podem ser fundidos ou conjugados a uma citocina. Por "citocina" como aqui usado entende-se um termo genérico para proteínas libertado por uma população de células que atuam noutra célula como mediadores intercelulares. Por exemplo, como descrito em Penichet et al., 2001, J. Immunol. Methods 248:91-101, as

citocinas podem ser ligadas ao anticorpo para fornecer uma matriz de propriedades desejáveis. Exemplos dessas citocinas são linfoquinas, monoquinas, e hormonas polipeptídios tradicionais. Incluídas entre as citocinas estão hormonas de crescimento tais como hormonas de crescimento humanas, hormona de crescimento humana N-metionilo, e hormona de crescimento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínas tais como hormona estimulante de folículo (HEF), hormona estimulante da tireoide (TSH), e hormona luteinizante (HL); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogénio placentário; fator alfa e beta de necrose tumoral; substância inibidora mulleriana; péptido associado a gonadotropina de rato; inibitina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoletina (TPO); fator de crescimento neural tais como FEC-beta; fator de crescimento plaquetário; fator de crescimento transformador (FCTs) tais como FCT-alfa e FCT-beta; fator I e II de crescimento tipo insulina; eritropoletina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões tais como interferão alfa, beta, e gama; fatores de estimulação de colónia (FEC) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, um fator de necrose tumoral tal como TNF-alfa ou TNF-beta; C5a; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e kit ligando (KL). Como aqui usado, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes, os equivalentes biologicamente ativos das citoquinas de sequências nativas.

Os anticorpos como aqui divulgados da presente invenção podem ser ligados, conjugados, ou operacionalmente ligados

a uma toxina, incluindo mas não limitado a toxinas de pequenas moléculas e toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes destas. Por exemplo, várias imunotoxinas e métodos de imunotoxina são descritos em Thrush et al., 1996, Ann. Rev. Immunol. 14:49-71. Toxinas de pequenas moléculas incluem mas não são limitadas a caliqueamicina, maitansina (US 5,208,020), tricoteno, e CC1065. O anticorpo da invenção pode ser conjugado para uma ou mais moléculas de maitansina (por exemplo cerca de 1 até cerca de 10 moléculas de maitansina por moléculas de anticorpo). A maitansina pode, por exemplo, ser convertida em May-SS-Me a qual pode ser reduzida a May-SH3 e reagida com anticorpo modificado (Chari et al., 1992, Cancer Research 52: 127-131) para gerar um conjugado maitansinóide-anticorpo. Outro conjugado de interesse compreende um anticorpo conjugado a uma ou mais moléculas caliqueamicina. A família de antibióticos caliqueamicina são capazes de produzir quebras de DNA de cadeia dupla a concentrações sub-picomolares. Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser usadas incluem mas não são limitados a γ_1^1 , α_2^1 , α_3 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, e Θ^1_1 , (Hinman et al., 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode et al., 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (US 5,714,586; US 5,712,374; US 5,264,586; US 5,773,001). 10 análogos de dolastatina tais como auristatina E (AE) e monometilaurostatina E (MMAE) podem ser usados como conjugados para os anticorpos da presente invenção (Doronina et al., 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco et al., 2003 Blood 102(4):1458-65). Toxinas úteis enzimaticamente ativas incluem mas não são limitadas a cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxinas de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricino, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*,

proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Ver, por exemplo, PCT WO 93/21232. A presente invenção divulga também um conjugado entre um anticorpo da presente invenção e um composto com atividade nucleolítica, por exemplo uma ribonuclease ou DNA endonuclease tal como uma deoxiribonuclease (Dnase).

Adicionalmente, um anticorpo como divulgado aqui pode ser ligado, conjugado, ou operacionalmente ligado a um radioisótopo para formar um radioconjugado. Uma variedade de isótopos radioativos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem, mas não são limitados a, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, e isótopos radioativos de Lu.

Um anticorpo como divulgado aqui pode ser conjugado a um "recetor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direcionamento a tumor em que o conjugado anticorpo-recetor é administrado ao doente, seguido por remoção do conjugado não ligado da circulação usando um agente de aclaramento e depois administração de um "ligando" (por exemplo avidina) que é conjugada a um agente citotóxico (por exemplo a radionucleótido). O anticorpo pode ser conjugado ou operacionalmente ligado a uma enzima com vista a empregar a Terapia Pró-fármaco Mediada por Enzima Dependente de Anticorpo (ADEPT). A ADEPT pode ser usada através de conjugação ou ligação operacional a anticorpo para uma enzima ativadora de pró-fármaco que converte um pró-fármaco (por exemplo um agente quimioterapêutico peptidilo, ver PCT WO 81/01145) num fármaco anti-cancro ativo. Ver, por exemplo, PCT WO 88/07378 e US 4,975,278. O componente enzimático do imunoconjugado útil para ADEPT inclui

qualquer enzima capaz de atuar num pró-fármaco de modo a cobrir a sua forma citotóxica mais ativa. Enzimas que são úteis incluem mas não são limitados a fosfatase alcalina útil para converter pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para converter pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosina deaminase útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica num fármaco anti cancro, 5-fluorouracilo; proteases, tais como protease serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-fármacos contendo péptido em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-fármacos que contêm substituintes D-aminoácido; enzimas de clivagem de hidrato de carbono tais como beta-galactosidase e neuramimidase útil para converter pró-fármacos glicosilados em fármacos livres; beta-lactamase úteis para converter fármacos derivatizados com .alfa.-lactânicos em fármacos livres; e penicilina amidases, tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para converter fármacos derivatizados na sua azotos de amina com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respetivamente, em fármacos livres. Em alternativa, os anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser usados para converter os pró-fármacos da invenção em fármacos ativos livres (ver, por exemplo, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados para libertação da abzima para uma população de células tumorais. Vários conjugados adicionais são contemplados para os anticorpos da presente invenção. Vários agentes quimioterapêuticos, agentes antiangiogénicos, inibidores de quinase de tirosina, e outros agentes terapêuticos são descritos abaixo, os quais podem encontrar uso como conjugados de anticorpo.

Também divulgados como conjugados de fusão e parceiros são os polipéptidos Fc. Assim um anticorpo pode ser um polipéptido multimérico Fc, compreendendo duas ou mais regiões Fc. A vantagem de uma tal molécula é que ele fornece múltiplos sítios de ligação para os receptores Fc com uma única molécula de proteína. As regiões Fc podem ser ligadas usando uma abordagem de manipulação química. Por exemplo, os Fab's e Fc's podem ser ligados por ligações tioéter originando os resíduos de cisteína nas articulações, gerando moléculas tais como FabFc2. As regiões Fc podem ser também ligadas usando manipulação disulfeto e/ou ligação química cruzada. As regiões Fc podem ser ligadas geneticamente. As regiões Fc num anticorpo podem ser ligadas geneticamente às regiões Fc geradas ligadas em tandem como descrito na US 2005/0249723, intitulada "Fc polipeptides with novel Fc ligand binding sites". Os polipéptidos Fc ligados em tandem podem compreender duas ou mais regiões Fc, preferencialmente uma até três, mas preferencialmente duas regiões Fc. Pode ser vantajoso explorar um certo número de construções manipuladas com vista a obter anticorpos ligados como homo- ou heterotandem com as propriedades estruturais e funcionais mais favoráveis. Os anticorpos ligados em tandem podem ser anticorpos ligados em homo-tandem, ou seja um anticorpo de um isotipo é fundido geneticamente a outro anticorpo do mesmo isotipo. É antecipado que porque existem sítios múltiplos de ligação FchR, C1q, e/ou FcRn nos polipéptidos Fc ligado sem tandem, as funções efetoras e/ou farmacocinéticas pode ser aumentada. Os anticorpos de diferentes isotipos podem ser ligados em tandem, referidos como anticorpos ligados em hetero-tandem. Por exemplo, devido à capacidade de visar os receptores Fc γ R e Fc α RI, um anticorpo que se liga a ambos Fc γ Rs e Fc α RI pode fornecer uma significativa melhoria clínica.

Para além dos anticorpos, uma proteína tipo anticorpo que encontra um papel em expansão na investigação e terapia é uma fusão de Fc (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). "Fusão Fc" é aqui entendido para ser sinónimo dos termos "imunodesina", "fusão Ig", "quimera Ig", e "recetor de globulina" (por vezes com hifens) como usado na técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Uma fusão de Fc é uma proteína em que um ou mais polipéptidos está operacionalmente ligado a Fc. Uma fusão de Fc combina a região Fc de um anticorpo, e assim as suas funções efetoras e farmacocinéticas favoráveis, com a região de ligação ao alvo de um recetor, ligando, ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. O papel da última é mediar o reconhecimento do alvo, e assim a sua funcionalidade análoga à região variável de anticorpo. Devido à sobreposição estrutural e funcional das fusões de Fc com os anticorpos, a discussão nos anticorpos aqui divulgados estende-se também a Fc.

Virtualmente qualquer proteína ou pequena molécula pode ser ligada a Fc para gerar uma fusão de Fc. Os parceiros da proteína de fusão podem incluir, mas não são limitados à região variável de qualquer anticorpo, a região de ligação a alvo de um recetor, uma molécula adesão, um ligando, uma enzima, uma citocina, uma quemocina, ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. Os parceiros das pequenas moléculas de fusão podem incluir qualquer agente terapêutico que dirijam a fusão de Fc para um alvo terapêutico. Tais alvos podem ser qualquer molécula, preferencialmente um recetor extracelular, que esteja implicado na doença.

Os parceiros de fusão e conjugados podem ser ligados a qualquer região de um anticorpo aqui divulgado, incluindo nos terminais N ou C, ou no mesmo resíduo entre os terminais. Um parceiro de fusão ou conjugado pode ser ligado ao terminal N or C do anticorpo, o mais preferencialmente ao terminal N. Vários ligantes podem encontrar uso para anticorpos ligados covalentemente a um parceiro de fusão ou conjugado. Por "ligante", "sequência ligante", "espaçador", "sequência de amarração" ou equivalentes gramaticais destes, aqui entende-se uma molécula ou grupo de moléculas (tais como um monómero ou polímero) que coneta duas moléculas e serve frequentemente para colocar as duas moléculas numa configuração preferida. Os ligantes são conhecidos na técnica; por exemplo, ligantes homo- ou hetero-bifuncionais como são bem conhecidos (ver, 1994 Pierce Chemical Company Catalog, secção técnica em agentes de reticulação, páginas 155-200). Podem ser usadas várias estratégias para ligar covalentemente as moléculas conjuntamente. Estas incluem, mas não são limitadas a ligações polipéptido entre terminais N e C de proteínas ou domínio de proteínas, ligação através de ligações dissulfureto, e ligação através de reagentes de reticulação química. Num aspeto destas formas de realização, o ligante é uma ligação péptidica, gerada por técnicas recombinantes ou síntese peptídica. O ligante pode conter resíduos de aminoácidos que fornecem flexibilidade. Assim, o péptido ligante pode incluir predominantemente os seguintes resíduos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, ou Thr. O péptide ligante deve ter um comprimento que é adequado para ligar duas moléculas de tal modo que assumam a conformação relativa correta a uma outra de modo que conservem a desejada atividade. Comprimentos adequados para este fim incluem pelo menos um e não mais de 50 resíduos de aminoácidos. Preferencialmente, o ligando é desde cerca de 1 até 30 aminoácidos de comprimento, com os

ligantes de 1 até 20 aminoácidos de comprimento sendo os mais preferidos. Ligantes úteis incluem polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS)_n, (GSGS)_n (GGGS)_n e (GGGS)_n, em que n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina, e outros ligantes flexíveis, como será apreciado pelos da técnica. Em alternativa, uma variedade de polímeros não proteicos, incluindo mas não limitado a polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, podem encontrar utilização como ligantes, que podem encontrar utilização para ligar os anticorpos como aqui divulgados a um parceiro de fusão ou conjugado, ou para ligar os anticorpos como aqui divulgados a um conjugado.

Produção de anticorpos

São divulgados métodos para produzir e testar anticorpos experimentalmente. Os métodos descritos são entendidos para ilustrar geralmente que um ou mais anticorpos podem ser produzidos e testados experimentalmente para obter anticorpos variantes. Métodos gerais para biologia molecular de anticorpo, expressão, purificação, e triagem são descritos em *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; e Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76; *Antibodies: A Laboratory Manual* by Harlow & Lane, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Numa forma de realização da presente invenção, são criados ácidos nucleicos que codificam os anticorpos, e que podem depois ser clonados nas células hospedeiras, expressas e ensaiadas, se desejado. Assim, os ácidos nucleicos, e

particularmente DNA, podem ser feitos de modo a codificar cada sequência de proteína. Estas práticas são realizadas usando procedimentos bem conhecidos. Por exemplo, vários métodos que podem ser usados na presente invenção são descritos em Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3^a Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 2001), e Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Como será apreciado pelos especialistas na técnica, a geração de sequências exatas para uma biblioteca compreendendo um grande número de sequências é potencialmente cara e demorada. Por "biblioteca" aqui entende-se um conjunto de variantes em qualquer forma, incluindo mas não limitado a uma lista de ácidos nucleicos ou sequências de aminoácidos, uma lista de ácidos nucleicos ou substituições de aminoácidos nas posições variáveis, uma biblioteca física compreendendo ácidos nucleicos que codificam as sequências de biblioteca, ou uma biblioteca física compreendendo as proteínas variantes, na forma purificada ou não purificada. Consequentemente, há uma diversidade de técnicas que podem ser usadas para gerar bibliotecas eficientemente como aqui divulgado. Esses métodos que podem encontrar uso de acordo com a presente divulgação são descritos ou referenciados nas US 6,403,312; US 2002/0048772; US 2002/0090648; US 2003/0130827; PCT WO 01/40091; e PCT WO 02/25588. Tais métodos incluem mas não são limitados a métodos de montagem de genes, métodos com base em PCR e métodos que usam variações de PCR, métodos baseados em reação em cadeia da ligase, métodos de oligos agrupados tais como os usados em embaralhamento sintético, métodos de amplificação propensos a erros e métodos que usam oligos com mutações aleatórias, métodos clássicos de mutagénese dirigida a sítio, mutagénese de cassette, e outra amplificação e métodos de síntese de genes. Como é conhecido na técnica, há uma variedade de kits disponíveis comercialmente e métodos para

montagem de genes, mutagénese, subclonagem de vetor, e afins, e esses produtos comerciais encontram utilidade na presente invenção para gerar ácidos nucleicos que codificam anticorpos.

Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos por cultura de células hospedeiras transformadas com ácido nucleico, preferencialmente um vetor de expressão, contendo ácido nucleico que codifica os anticorpos, sob condições apropriadas para induzir ou causar a expressão da proteína. As condições apropriadas para a expressão irão variar com a escolha do vetor de expressão e a célula hospedeira, e serão facilmente verificadas por um especialista na técnica através de experiências de rotina. Uma grande variedade de células hospedeiras apropriadas pode ser usada, incluindo mas não limitadas a células de mamífero, bactérias, células de inseto, e leveduras. Por exemplo, várias linhas de células que podem ser úteis na presente invenção são descritas no catálogo de linhas de células ATCC®, disponíveis na American Type Culture Collection.

Preferencialmente os anticorpos são expressos em sistemas de expressão em mamíferos, incluindo sistemas nos quais as construções de expressão são introduzidas nas células de mamífero usando vírus tais como retrovírus ou adenovírus. Podem ser usadas quaisquer células de mamífero, com as células humanas, de ratinho, rato, hamster, e de primata sendo particularmente preferidas. As células adequadas incluem também células de investigação conhecidas, incluindo mas não limitado a células T Jurkat, NIH3T3, OHC, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NS0 e variantes destas. Em alternativa, as bibliotecas de proteínas são expressas nas células bacterianas. Os sistemas de expressão bacterianos são conhecidos na técnica, e incluem *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus*

subtilis, *Streptococcus cremoris*, e *Streptococcus lividans*. Em alternativa, os anticorpos são produzidos em células de inseto (por exemplo Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) ou células de levedura (por exemplo *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc). Em alternativa os anticorpos são expressos *in vitro* usando sistemas de translação isentos de células. Os sistemas de translação *in vitro* derivados tanto de células procarióticas (por exemplo *E. coli*) como de células eucarióticas (por exemplo gérmen de trigo, reticulócitos de coelho) estão disponíveis e podem ser escolhidas com base nos níveis de expressão e propriedades funcionais da proteína de interesse. Por exemplo, como apreciado pelos especialistas na técnica, a translação *in vitro* é requerida para algumas tecnologias de exibição, por exemplo exibição em ribossomas. Além disso, os anticorpos podem ser produzidos por métodos de síntese química. Também os sistemas de expressão transgénicos tanto animais (por exemplo vacas, ovelhas ou leite de cabra, ovos de galinha embrionados, larvas completas de inseto, etc.) e vegetal (por exemplo milho, tabaco, lentilha, etc.)

Os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da presente invenção, como definido nas reivindicações, podem ser incorporados no vetor de expressão com vista a expressar a proteína. Uma diversidade de vetores de expressão podem ser utilizados para a expressão de proteína. Os vetores de expressão podem compreender vetores extracromossomais auto replicantes ou vetores que se integram num genoma hospedeiro. Os vetores de expressão são construídos para serem compatíveis com o tipo de célula hospedeira. Assim, os vetores de expressão que encontram uso de acordo com a presente divulgação incluem mas não são limitados aos que viabilizam a expressão de proteína em células de mamífero, bactérias, células de inseto, leveduras, e em sistemas *in*

vitro. Tal como é conhecido na técnica, uma diversidade de vetores de expressão estão disponíveis, comercialmente ou de outro modo, os quais podem encontrar uso na presente invenção para expressarem anticorpos.

Os vetores de expressão tipicamente compreendem uma proteína operacionalmente ligada com sequências de controlo ou reguladoras, marcadores selecionáveis, quaisquer parceiros de fusão, e/ou elementos adicionais. Por "operacionalmente ligado" aqui entende-se que o ácido nucleico é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Geralmente, estes vetores de expressão incluem ácido nucleico regulador transcracional e translacional operacionalmente ligado ao ácido nucleico que codifica o anticorpo, e são tipicamente apropriados para a célula hospedeira usada para expressar a proteína. Em geral, as sequências reguladoras transcrpcionais e translacionais podem incluir sequências promotoras, sítios de ligação ribossomais, sequências transcrpcionais de início e paragem, sequências translacionais de início e paragem, e sequências melhoradoras ou ativadoras. Tal como é conhecido na técnica, os vetores de expressão tipicamente contêm um gene de seleção ou marcador para permitir a seleção das células hospedeiras transformadas contendo o vetor de expressão. Os genes de seleção são bem conhecidos na técnica e irão variar com a célula hospedeira usada.

Os anticorpos podem ser operacionalmente ligados a um parceiro de fusão para poderem atingir a proteína expressa, purificação, triagem, exibição, e afins. Os parceiros de fusão podem estar ligados à sequência de anticorpo através de sequências de ligantes. A sequência ligante compreende geralmente um pequeno número de aminoácidos, tipicamente menos que dez, embora ligantes mais longos possam ser usados. Tipicamente, as sequências ligantes são

selecionadas para serem flexíveis e resistentes à degradação. Tal como será avaliado pelos especialistas na técnica, qualquer de uma vasta variedade de sequências pode ser usada como ligante. Por exemplo, uma sequência ligante comum compreende a sequência de aminoácidos GGGGS. Um parceiro de fusão pode ser uma sequência alvo ou de sinalização que direciona o anticorpo e quaisquer parceiros de fusão associados para a desejada localização celular ou para meios extracelulares. Como é conhecido na técnica, certas sequências de sinalização podem visar uma proteína a ser secretadas para o meio de crescimento, ou para o espaço periplasmático, localizado entre a membrana interna e a externa da célula. Um parceiro de fusão pode ser também uma sequência que codifica um péptido ou proteína que viabiliza a purificação e/ou triagem. Tais parceiros de fusão incluem mas não são limitados a etiquetas de polihistidina (His-etiquetas) (por exemplo H6 e H10 ou outras etiquetas para uso com sistemas Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado (CAMI) (por exemplo colunas de afinidade Ni^{+2})), fusões GST, fusões MBP, Strep-tag, a sequência alvo de biotinilação BSP da enzima bacteriana BirA, e etiquetas epitopo que são visadas por anticorpos (por exemplo etiquetas c-myc, etiquetas bandeira, e afins). Tal como será avaliado pelos especialistas na técnica, essas etiquetas podem ser úteis para purificação, para triagem, ou ambas. Por exemplo, um anticorpo pode ser purificado usando uma etiqueta His imobilizando-o numa coluna de afinidade Ni^{+2} , e depois após purificação a mesma etiqueta His pode ser usada para imobilizar o anticorpo numa placa revestida a Ni^{+2} para realizar um ELISA ou outro ensaio de ligação (como descrito abaixo). Um parceiro de fusão pode viabilizar o uso de um método de seleção para testar anticorpos (ver abaixo). Os parceiros de fusão que viabilizam uma diversidade de métodos de seleção são bem conhecidos na técnica, e todos estes encontram uso na

presente invenção. Por exemplo, fundindo os membros de uma biblioteca de anticorpo ao gene da proteína III, a apresentação de fagos pode ser utilizada (Kay et al., *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30:10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228:1315-1317). Os parceiros de fusão podem viabilizar anticorpos a serem marcados. Em alternativa, um parceiro de fusão pode ligar-se a uma sequência específica no vetor de expressão, permitindo que o parceiro de fusão e anticorpo associado seja ligado covalentemente ou não covalentemente com o ácido nucleico que os codifica.

Os métodos de introdução de ácido nucleico exógeno nas células hospedeiras são bem conhecidos na técnica, e vão variar com a célula hospedeira usada. As técnicas incluem mas não são limitadas a transfeção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, tratamento de cloreto de cálcio, transfeção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, eletroporação, infecção viral ou de fago, encapsulação dos polinucleótido(s) em liposomas, e microinjeção direta de DNA nos núcleos. No caso de células de mamífero, a transfeção pode ser transitória ou estável.

Preferencialmente, os anticorpos são purificados ou isolados após expressão. As proteínas podem ser isoladas ou purificadas numa diversidade de vias conhecidas dos especialistas na técnica. Métodos de purificação padrão incluem técnicas cromatográficas, incluindo troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade, calibração ou filtração em gel, e fase reversa, realizados à pressão atmosférica ou a alta pressão usando sistemas tais como FPLC e HPLC. Os métodos de purificação incluem também técnicas eletroforéticas, imunológicas, de precipitação, de diálise, e cromatofocusação. Técnicas de ultrafiltração e

diafiltração, em conjunção com concentração de proteína, são também úteis. Como é bem conhecido na técnica, uma diversidade de proteínas naturais liga Fc e anticorpos, e estas proteínas podem encontrar utilização para purificação de anticorpos como aqui divulgado. Por exemplo, as proteínas bacterianas A e G ligam-se à região Fc. Do mesmo modo, a proteína bacteriana L liga-se à região Fab de alguns anticorpos, como evidentemente faz o antigénio alvo do anticorpo. A purificação pode, muitas vezes, ser viabilizada por um parceiro de fusão particular. Por exemplo, os anticorpos podem ser purificados usando resina de glutationa se for empregue fusão GST, cromatografia de afinidade Ni^{+2} se é empregue uma etiqueta His, ou se é usado anticorpo anti-bandeira imobilizado. Para orientação geral em técnicas de purificação adequadas, ver, por exemplo Protein Purification: Principles and Practice, 3^a Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994 incorporado na integre como referência. O grau de purificação necessário variará dependendo da triagem ou da utilização dos anticorpos. Em alguns casos não é necessária purificação. Por exemplo numa forma de realização, se os anticorpos são secretados, a triagem pode ser feita diretamente a partir dos meios. Como é bem conhecido na técnica, alguns métodos de seleção não envolvem a purificação das proteínas. Assim, por exemplo, se uma biblioteca de anticorpos é feita numa biblioteca de apresentação de fagos, a purificação da proteína pode não ser realizada.

Experimentação *in vitro*

Os anticorpos podem ser triados usando uma diversidade de métodos, incluindo mas não limitado aos que usam ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo* à base de células, e seleção de tecnologias. Automação e tecnologias de rastreio de alto rendimento podem ser utilizadas nos procedimentos de

triagem. A triagem pode empregar o uso de um parceiro de fusão ou marcador. O uso de parceiros de fusão foi discutido acima. Por "marcado" aqui entende-se que os anticorpos da invenção têm um ou mais elementos, isótopos, ou compostos químicos anexados para permitir a deteção de uma triagem. Em geral, os marcadores inserem-se em três classes: a) marcadores imunológicos, os quais podem ser um epítopo incorporado como um parceiro de fusão que é reconhecido por um antícorpo, b) marcadores isotópicos, os quais podem ser radioativos ou isótopos pesados, e c) pequenas moléculas marcadoras, as quais podem incluir corantes fluorescentes e colorimétricos, ou moléculas tais como biotina que permite outros métodos de marcação. Os marcadores podem ser incorporados no composto em qualquer posição e podem ser incorporados *in vitro* ou *in vivo* durante a expressão de proteína.

Preferencialmente as propriedades funcionais e/ou biofísicas de anticorpos são triados num ensaio *in vitro*. Os ensaios *in vitro* podem permitir uma ampla gama dinâmica para propriedades de triagem de interesse. As propriedades dos anticorpos que podem ser triados incluem mas não são limitados a estabilidade, solubilidade, e afinidade para os ligantes Fc, por exemplo FcγRs. Podem ser triadas múltiplas propriedades simultaneamente ou individualmente. As proteínas podem ser purificadas ou não purificadas, dependendo dos requisitos do ensaio. Numa forma de realização a triagem é um ensaio de ligação qualitativo ou quantitativo para ligar anticorpos a uma proteína ou molécula não proteína que se conhece ou se pensa ligar o antícorpo. Numa forma de realização a preferida a triagem é um ensaio de ligação para medir a ligação ao抗ígeno alvo. Numa forma de realização alternativa a triagem é um ensaio para ligação dos anticorpos a um ligante Fc, incluindo mas não limitados à família dos FcγRs, o receptor

FcRn neonatal, a proteína complemento C1q, e as proteínas bacterianas A e G. Os referidos ligandos Fc podem ser de qualquer organismo, com os humanos, de ratinhos, de ratos, de coelhos, e de macacos sendo preferidos. Podem ser realizados ensaios usando uma diversidade de métodos conhecidos na técnica, incluindo mas não limitado a ensaios com base em FRET (Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência) e BRET (Transferência de Energia de Ressonância de Bioluminescência), AlphaScreen™ (Ensaio de Proximidade Luminescente homogénea amplificada), Ensaio de Proximidade de Cintilação, ELISA (Ensaio Imunosorbente Ligado a Enzima), SPR (Ressonância plasmónica de superfície, também conhecida como Biacore™), calorimetria de titulação isotérmica, calorimetria diferencial exploratória, eletroforese em gel, e cromatografia incluindo filtração em gel. Estes e outros métodos podem assumir a vantagem de algum parceiro de fusão ou marcador do anticorpo. Ensaios podem empregar uma diversidade de métodos de deteção incluindo mas não limitado a cromogénicos, fluorescentes, luminescentes, ou marcadores isotópicos.

As propriedades biofísicas de anticorpos, por exemplo estabilidade e solubilidade, podem ser triadas usando uma diversidade de métodos conhecidos na técnica. A estabilidade de proteína pode ser determinada medindo o equilíbrio termodinâmico entre estados dobrados e não dobrados. Por exemplo, os anticorpos da presente invenção podem ser não dobrados usando desnaturante químico, calor, ou pH, e esta transição pode ser monitorizada usando métodos incluindo mas não limitado a espetroscopia de dicroísmo circular, espetroscopia de fluorescência, espetroscopia de absorção, espetroscopia de NMR, calorimetria, e proteólise. Tal como será avaliado pelos especialistas na técnica, os parâmetros cinéticos das

transições de dobragem e não dobragem podem também ser monitorizados usando estas e outras técnicas. A solubilidade e integridade estrutural global de um anticorpo podem ser determinadas quantitativamente ou qualitativamente usando um vasta gama de métodos que são conhecidos na técnica. Métodos que podem encontrar uso na presente invenção para caracterizar as propriedades biofísicas de anticorpos incluem eletroforese em gel, focagem isoelétrica, eletroforese capilar, cromatografia tal como cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca iônica, e cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa, mapeamento peptídico, mapeamento de oligossacárido, espetrometria de massa, espetroscopia de absorção ultravioleta, espetroscopia de fluorescência, espetroscopia de dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica, calorimetria diferencial exploratória, ultra-centrifugação analítica, dispersão de luz dinâmica, proteólise, e ligação cruzada, medição de turbidez, ensaios de retardamento de filtro, ensaios imunológicos, ensaios de ligação de corantes fluorescentes, ensaios de coloração de proteína, microscopia, e deteção de agregados via ELISA ou outro ensaio de ligação. As análises estruturais empregam técnicas de cristalografia de raio X e espetroscopia de NMR pode também encontrar utilização. A estabilidade e/ou a solubilidade podem ser medida determinando a quantidade de solução de proteína após algum período de tempo definido. Neste ensaio, a proteína pode ser ou não ser exposta a algumas condições extremas, por exemplo temperatura elevada, pH baixo, ou presença de desnaturante. Porque a função tipicamente requere uma proteína estável, solúvel, e/ou bem dobrada/estruturada, os ensaios funcionais e de ligação acima mencionados fornecem também modos para realizar uma tal medida. Por exemplo, uma solução compreendendo um anticorpo pode ser ensaiada quanto à sua

capacidade para ligar o抗igenio alvo, depois exposta a elevada temperatura por um ou mais períodos de tempo definidos, depois ensaiada novamente quanto à ligação抗igenio. Porque a proteína agregada e não dobrada não é esperado que seja capaz de ligar抗igenio, a quantidade de atividade restante fornece uma medida da estabilidade e solubilidade do anticorpo.

Preferencialmente a biblioteca é triada usando um ou mais ensaios com base celular ou *in vitro*. Para esses ensaios, anticorpos, purificados ou não purificados, são tipicamente adicionados exogenamente de modo a que as células sejam expostas a variantes individuais ou grupos de variantes pertencendo à biblioteca. Estes ensaios são tipicamente, mas não sempre, com base na biologia da capacidade do anticorpo para ligar a抗igenio e mediar algum evento bioquímico, por exemplo funções efetoras como lise celular, fagocitose, inibição de ligação ligando/recetor, inibição do crescimento e/ou proliferação, apoptose e afins. Esses ensaios frequentemente envolvem a monitorização da resposta das células ao anticorpo, por exemplo sobrevivência celular, morte celular, fagocitose celular, lise celular, alteração na morfologia celular, ou ativação transcricional tal como expressão celular de um gene natural ou gene repórter. Por exemplo, esses ensaios podem medir a capacidade dos anticorpos para eliciar CMCA, FCDA, ou CDC. Para alguns ensaios células adicionais ou componentes, ou seja para além das células alvo, pode ter que ser adicionadas, por exemplo complemento sérico, ou células efetoras tais como monócitos do sangue periférico (CMSPs), células NK, macrófagos, e afins. Essas células adicionais podem ser de qualquer organismo, preferencialmente humanos, ratinhos, ratos, coelhos, e macaco. Anticorpos reticulados ou monoméricos podem causar apoptose de certas linhas de células expressando o抗igenio alvo do anticorpo, ou podem

mediar o ataque nas células alvo por células imunitárias as quais foram adicionadas ao ensaio. Métodos para monitorizar a morte celular ou a viabilidade são conhecidos na técnica, e incluem o uso de corantes, fluoróforos, imunoquímicos, citoquímicos, e reagentes radioativos. Por exemplo, ensaios de caspase ou flouroconjungados anexina podem viabilizar a apoptose a ser medida, e absorção ou liberação de substratos radioativos (por exemplo ensaio de libertação Crómio-51) ou a redução metabólica de corantes fluorescentes tais como azul alamar pode permitir o crescimento celular, ativação da proliferação ou ativação a ser monitorizada. Numa forma de realização preferida, é usado o ensaio de citotoxicidade com base em EutDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA). Em alternativa, células alvo mortas ou danificadas podem ser monitorizadas medindo a libertação de uma ou mais proteínas intracelulares naturais, por exemplo lactato desidrogenase. A ativação transcripcional pode também servir como um método para ensaiar a função em ensaios com base celular. Neste caso, a resposta pode ser monitorizada ensaiando os genes ou proteínas naturais que podem ser regulados para cima ou regulados para baixo, por exemplo a libertação de certas interleucinas pode ser medida, ou em alternativa a leitura pode ser através de luciferase ou construção de repórter GFP. Ensaios à base de células podem também envolver as mudanças de mudanças morfológicas de células como resposta à presença de um anticorpo. Tipos de células para tais ensaios podem ser procarióticas ou eucarióticas, e pode ser empregue uma diversidade de linhas de células que são conhecidas na técnica. Em alternativa, triagens com base celular são realizadas usando células que foram transformadas ou transfetadas com ácidos nucleicos que codificam os anticorpos.

Os ensaios *in vitro* incluem mas não são limitados a ensaios de ligação, CMCA, CDC, fagocitose, citotoxicidade, proliferação, apoptose, necrose, paragem do ciclo celular, libertação peróxido/ozono, quimiotaxia de células efetoras, inibição desses ensaios por redução da função efetora dos anticorpos; intervalos de atividades como >100x melhoramento ou >100x redução, misturas de ativação do recetor e os resultados do ensaio que são esperados desses perfis de recetor.

Experimentação *in vivo*

As propriedades biológicas dos anticorpos da presente invenção podem ser caracterizadas na célula, tecido, e experiência de organismo completo. Como é conhecido na técnica, os fármacos são muitas vezes testados em animais, incluindo mas não limitado a ratinho, ratos, coelhos, cães, gatos, porcos, e macacos, com vista a medir a eficácia do fármaco para tratamento contra uma doença ou modelo de doença, ou medir as farmacocinéticas, toxicidade, e outras propriedades do fármaco. Os referidos animais podem ser referidos como modelos de doença. Em relação aos anticorpos como aqui divulgados, surge um desafio particular quando se usam modelos animais para avaliar o potencial para eficácia em humano de polipeptídos candidatos - isto é devido, pelo menos em parte, ao facto dos anticorpos que tem um efeito específico sobre a afinidade para um recetor humano Fc podem não ter um efeito de afinidade semelhante ao recetor de animais ortólogos. Estes problemas podem ser agravados pelas ambiguidades inevitáveis associadas com a atribuição correta de ortólogos verdadeiros (Mechetina et al., Immunogenetics, 2002 54:463-468), e o facto que alguns ortólogos simplesmente não existem no animal (por exemplo os humanos possuem um FcγRIIa enquanto que o ratinho não). As terapêuticas são frequentemente testadas em ratinho,

incluso mas não limitado a rato nô, rato SCID, rato xeno enxertado, e rato transgénico (incluindo noquins e nocautes). Por exemplo, um anticorpo da presente invenção que se destina a uma terapêutica antineoplásica, pode ser testada num modelo de cancro e rato, por exemplo um rato xeno enxertado. Neste método, um tumor ou linha de células tumoral é enxertado em ou injetado num rato, e subsequentemente o rato é tratado com a terapêutica para determinar a capacidade do anticorpo para reduzir ou inibir o crescimento tumoral e as metástases. Uma abordagem alternativa é o uso de um modelo de murino SCID no qual os ratinhos imunodeficientes são injetados com Linfócitos do Sangue Periférico (PBLs) humanos, conferindo um sistema imunitário semifuncional e humano - com uma matriz apropriada de FcRs humanos - ao rato que foi subsequentemente injetado com anticorpos ou polipeptídos Fc que visa as células tumorais humanas injetadas. Num tal modelo, os polipeptídos Fc que visam o desejado抗原 (tal como her2/neu em células cancerígenas de ovário SkOV3) interagem com PBLs humanos dentro do rato para envolver funções efetoras tumoricidas. Tal experimentação pode fornecer dados significativos para determinação do potencial do referido anticorpo a ser usado como uma terapêutica. Quaisquer organismos, preferencialmente mamíferos, podem ser usados para teste. Por exemplo devido à sua semelhança genética com os humanos, os macacos podem ser modelos terapêuticos adequados, e portanto podem ser usados para testar a eficácia, toxicidade, farmacocinéticas, ou outras propriedades dos anticorpos da presente invenção. Os testes de anticorpos da presente invenção em humanos são, em última análise, necessários para aprovação dos medicamentos, e, assim, obviamente estas experiências estão contempladas. Portanto os anticorpos da presente invenção podem ser testados em humanos para

determinar a sua eficácia terapêutica, toxicidade, farmacocinéticas, e/ou outras propriedades clínicas.

Os anticorpos como aqui descritos podem conferir desempenho superior nas terapêuticas contendo Fc em modelos animais ou em humanos. Os perfis de ligação ao recetor desses anticorpos, como descrito nesta especificação, podem, por exemplo, ser selecionados para aumentar a potência de fármacos citotóxicos ou para visar funções efetoras ou células efetoras específicas para melhorar a seletividade da ação dos fármacos. Mais ainda, perfis de ligação a recetor podem ser selecionados que podem reduzir algumas ou todas as funções efetoras reduzindo assim os efeitos secundários ou a toxicidade do tal fármaco contendo Fc. Por exemplo, um anticorpo com ligação reduzida a Fc γ RIIIa, Fc γ RI e Fc γ RIIa pode ser selecionado para eliminar a maioria da função efetora mediada por célula, ou um anticorpo com reduzida ligação a C1q pode ser selecionado para limitar as funções efetoras mediadas por complemento. Em alguns contextos, tais funções efetoras são conhecidas terem potenciais efeitos tóxicos, portanto eliminando-os pode aumentar a segurança do fármaco carregando Fc e essa segurança aumentada pode ser caracterizada em modelos animais. Em certos contextos, essas funções efetoras são conhecidas por mediarem a desejada atividade terapêutica, assim aumentando-a podem aumentar a atividade ou a potência do fármaco carregando Fc e essa atividade ou potência melhorada pode ser caracterizada em modelos animais.

Os anticorpos otimizados podem ser testados numa diversidade de modelos tumorais ortotópicos. Estes modelos animais clinicamente relevantes são importantes no estudo de patofisiologia e terapia de cancros agressivos como o cancro pancreático, da próstata e da mama. Ratinhos privados de imunidade incluindo, mas não limitado a

ratinhos nus atípicos ou SCID são frequentemente usados na classificação de disseminação do tumor local e sistémica do local de injeção intraórgão (por exemplo pâncreas, próstata ou glândula mamária) de células tumorais humanas ou fragmentos de doentes dadores.

Os anticorpos da presente invenção podem ser avaliados quanto à eficácia em modelos animais clinicamente relevantes de várias doenças humanas. Em muitos casos, modelos relevantes incluem vários animais transgénicos para抗igénios específicos de tumores.

Modelos transgénicos relevantes tais como aqueles que expressam receptores Fc humanos (por exemplo, CD16 incluindo a cadeia gama, Fc γ R1, RIIa/b, e outros) devem ser usados para avaliar os anticorpos de teste e fusões Fc quanto à sua eficácia. A avaliação dos anticorpos por introdução de genes humanos que medeiam a função efetora direta ou indiretamente em rato ou outros roedores que podem viabilizar estudos fisiológicos de eficácia na toxicidade tumoral ou outras doenças tais como distúrbios autoimunes e RA. Os receptores Fc humanos tais como Fc γ RIIIa podem possuir polimorfismos como os da posição 158 V ou F que podem viabilizar ainda mais a introdução de específicos e combinações polimorfismos humanos nos roedores. Os vários estudos envolvendo FcRs específicos de polimorfismo não são, no entanto, limitados a esta secção e englobam todas as discussões e aplicações de FcRs em geral como especificado ao longo destes anticorpos de aplicação como aqui divulgados pode conferir atividade superior em fármacos contendo Fc nesses modelos transgénicos, em variantes específicas com perfis de ligação otimizado para atividade mediada por Fc γ RIIIa humana pode mostrar atividade superior em ratinhos CD16 transgénicos. Melhorias similares da eficácia, em ratinhos transgénicos para os

outros receptores Fc humanos, por exemplo Fc γ RIIa, Fc γ RI, etc., podem ser observadas para os anticorpos com os perfis de ligação otimizados para os receptores respetivos. Ratinhos transgénicos para múltiplos receptores humanos deveriam mostrar atividade melhorada para anticorpos com perfis de ligação otimizados para os correspondentes receptores múltiplos, por exemplo como mostrado na Figura 5.

Devido às dificuldades e ambiguidades associadas com o uso de modelos animais para caracterizar a eficácia potencial dos anticorpos terapêuticos candidatos num doente humano, alguns polipeptídos variantes aqui divulgados podem encontrar utilidade como procuradores para avaliar a eficácia potencial em humanos. Tais moléculas procuradoras devem preferencialmente mimetizar - no sistema animal - a biologia FcR e/ou de complemento do correspondente anticorpo humano candidato. Este mimetismo é mais provável que seja manifestado pelas afinidades de associação relativas entre anticorpos e animais específicos vs. receptores humanos. Por exemplo, se se está a usar um modelo de ratinho para avaliar a potencial eficácia em humanos de um anticorpo que tem afinidade aumentada para Fc γ RIIIa humano, uma variante de procuração apropriada deverá ter afinidade aumentada para Fc γ RIII-2 de ratinho (CD16-2 de ratinho). Em alternativa se se está a usar um modelo de ratinho para avaliar a potencial eficácia em humano de um anticorpo que tem afinidade reduzida para o Fc γ RIIb inibitório humano, uma variante de procuração apropriada deverão ter afinidade reduzida para Fc γ RII de ratinho. Também deve ser notado que os anticorpos procuradores podem ser criados no contexto de um anticorpo humano, um anticorpo animal, ou ambos.

O teste dos anticorpos pode incluir estudos de eficácia em primatas (por exemplo modelo de macaco cinomólogo) para

facilitar a avaliação da depleção de células alvo específicas abrigando o antígeno alvo. Outros modelos de primatas incluem mas não são limitados aos de macacos rhésus e polipeptídios Fc em estudos terapêuticos de autoimune, transplante e cancro.

São realizados estudos de toxicidade para determinar os efeitos relacionados de anticorpo ou fusão Fc que não podem ser avaliados em perfis de farmacologia padrão ou ocorrem somente após administração repetida do agente. A maioria dos testes de toxicidade são realizados em duas espécies - um roedor e um não roedor - para assegurar que quaisquer efeitos adversos não esperados não são desprezados antes que novas entidades terapêuticas sejam introduzidas no homem. Em geral, estes modelos podem medir uma diversidade de toxicidades incluindo genotoxicidade, toxicidade crônica, imunogenicidade, toxicidade reprodutiva/de desenvolvimento e carcinogenicidade. Incluídos nos parâmetros acima mencionados estão medidas padrão de consumo de alimentos, peso corporal, formação de anticorpo, química clínica, e exame macro e microscópico de órgãos/tecidos padrão (por exemplo cardiotoxicidade). Outros parâmetros de medição são o traumatismo no local de injeção e a medição dos anticorpos neutralizantes, se algum. Tradicionalmente, as terapêuticas de anticorpo monoclonais, nuas ou conjugadas são avaliadas quanto à reatividade cruzada com os tecidos normais, produção de imunogenicidade/anticorpo, toxicidade de conjugado ou ligante e toxicidade "bystander" de espécies radiomarcadas. No entanto, tais estudos podem ter de ser individualizados para responder às preocupações específicas e seguindo o conjunto de orientações por ICH S6 (Estudos de segurança para produtos biotecnológicos, também mencionado anteriormente). Como tal, os princípios gerais dos produtos são suficientemente bem caracterizados e relativamente aos

quais impurezas/contaminantes foram removidos, que o material de teste é comparável ao longo do desenvolvimento, e cumprimento das GLP.

As farmacocinéticas (PK) dos anticorpos da invenção podem ser estudadas numa diversidade de sistemas animais, com o mais relevante sendo o de primatas não humanos tais como os cinomolgos, macacos rhésus. Administrações i.v./s.c. únicas ou repetidas de mais de uma gama de dosagem de 6000-vezes (0,05-300 mg/kg) podem ser avaliadas sobre a meia vida (dias a semanas) usando concentração plasmática e depuração assim como pode ser medido o volume de distribuição a um estado de equilíbrio e nível de absorbância sistémica. Exemplos desses parâmetros de medida incluem geralmente a concentração plasmática máxima observada (C_{max}), o tempo para atingir C_{max} (T_{max}), e a área sob a curva de concentração plasmática-tempo de tempo de 0 até ao infinito [$AUC(0-\infty)$] e eliminação da semivida aparente ($T_{1/2}$). Outros parâmetros medidos pode incluir análise comportamental dos dados de concentração-tempo obtidos a seguir à administração e biodisponibilidade de i.v.. Exemplos de estudos farmacológicos/toxicológicos usando cinomologos foram estabelecidos para Rituxan e Zevalina em que os anticorpos monoclonais para CD20 são de reação cruzada. A biodistribuição, dosimetria (para anticorpos radiomarcados), e estudos de PK podem também ser feitos em modelos de roedores. Esses estudos de avaliação da tolerância em todas as doses administradas, toxicidade para os tecidos localizados, localização preferencial para modelos animais de roedores xenoenxertados, depleção de células alvo (por exemplo células CD20 positivas).

Os anticorpos aqui descritos podem conferir farmacocinéticas superiores nas terapêuticas contendo Fc em sistemas animais ou em humanos. Por exemplo, a ligação

aumentada a FcRn pode aumentar a meia vida e a exposição ao fármaco contendo Fc. Em alternativa, a ligação diminuída a FcRn pode diminuir a meia vida e a exposição ao fármaco contendo Fc nos casos em que a exposição reduzida é favorável tal como quando esse fármaco tem efeitos secundários.

É conhecido na técnica que o conjunto de receptores Fc é expresso diferencialmente em vários tipos de células imunitárias, assim como em diferentes tecidos. Distribuição diferencial nos tecidos de receptores Fc pode em última análise ter um impacto nas propriedades farmacodinâmicas (PD) e farmacocinéticas (PK) de anticorpos da presente invenção. Porque os anticorpos da apresentação têm afinidades variáveis com o conjunto de receptores Fc, um rastreio suplementar dos polipéptidos quanto às propriedades de PD e/ou PK pode ser extremamente útil para definir o equilíbrio ótimo de PD, PK, e a eficácia terapêutica conferida por cada polipéptido candidate.

Estudos de farmacodinâmica podem incluir, mas não são limitados a, visar células tumorais específicas ou bloquear os mecanismos de sinalização, medir a depleção do抗ígeno alvo expressando células ou sinais, etc. Os anticorpos da presente invenção podem visar populações de células efetoras específicas e deste modo direcionar fármacos contendo Fc para recrutar certas atividades para melhorar a potência ou para aumentar a penetração num compartimento fisiológico particularmente favorável. Por exemplo, a atividade de neutrófilos e localização podem ser visados por um anticorpo que preferencialmente visa Fc γ RIIb. Tais efeitos farmacodinâmicos podem ser demonstrados em modelos animais ou em humanos.

Uso clínico

Os anticorpos da presente invenção podem ser usados para vários fins terapêuticos. Tal como será apreciado por aqueles na técnica, os anticorpos da presente invenção podem ser usados para quaisquer fins terapêuticos que usem anticorpos e os afins. Os anticorpos podem ser administrados a um doente para tratar doenças incluindo mas não limitadas a cancro, doenças autoimunes e inflamatórias, e doenças infeciosas.

Um "doente" como aqui descrito inclui tanto humanos como outros animais, preferencialmente mamíferos e mais preferencialmente humanos. Portanto os anticorpos como aqui descrito têm aplicações nas terapias humanas e veterinária. O termo "tratamento" ou "tratar" na presente invenção entende-se que inclui o tratamento terapêutico, assim como profilático, ou medidas de supressão de uma doença ou distúrbio. Assim, por exemplo, a administração bem sucedida de um antícorpo antes do início da doença resulta no tratamento da doença. Como outro exemplo, a administração bem sucedida de um antícorpo otimizado após manifestação clínica da doença para combater os sintomas da doença compreende o tratamento da doença. "Tratamento" e "tratar" incluem também a administração de um antícorpo otimizado após o aparecimento da doença com vista a erradicar a doença. A administração bem sucedida de um agente após o início e após os sintomas clínicos serem desenvolvidos, com possível redução dos sintomas clínicos e talvez a melhoria da doença, compreende o tratamento da doença. Aqueles "com necessidade de tratamento" incluem mamíferos já com a doença ou distúrbio, assim como aqueles com tendência para ter a doença ou distúrbio, incluindo aqueles em que a doença ou distúrbio é para ser prevenido.

Um anticorpo como aqui descrito pode ser administrado a um doente com uma doença envolvendo expressão inapropriada de uma proteína ou outra molécula. No âmbito da presente divulgação isto significa a inclusão de doenças e distúrbios caracterizados por proteínas aberrantes, devido por exemplo a alterações na quantidade da proteína presente, da localização da proteína, da modificação postranslacional, do estado conformacional, a da presença de um mutante ou proteína do patogénio, etc. De modo semelhante, a doença ou distúrbio pode ser caracterizado pelas moléculas de alterações incluindo mas não limitado a polissacáridos e gangliósidos. Uma superabundância pode ser devida a qualquer causa, incluindo mas não limitado a sobre expressão a nível molecular, aparecimento prolongado ou acumulado no sítio de ação, ou atividade aumentada da proteína em relação ao normal. Incluídos nesta definição estão doenças e distúrbios caracterizados por uma redução da proteína. Esta redução pode ser devida a qualquer causa, incluindo mas não limitado a expressão reduzida a nível molecular, aparecimento encurtado ou reduzido no sítio de ação, formas mutantes da proteína, ou atividade reduzida da proteína em relação ao normal. Uma tal superabundância ou redução da proteína pode ser medida em relação à expressão normal, aparecimento, ou atividade da proteína, e a medida referida pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento e/ou testagem clínica dos anticorpos da presente invenção.

Por "cancro" e "canceroso" aqui refere-se a ou descreve a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem mas não são limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluindo liposarcoma), tumores neuroendócrinos, mesotelioma, schwanoma, meningioma,

adenocarcinoma, melanoma, e leucemia ou malignidades linfoides.

Exemplos mais específicos de tais cancros incluem malignidades hematológicas, tais como linfomas não Hodgkin (LNH). Os cancros LNH incluem mas não são limitados a Linfoma de Burkitt (LB), linfoma linfocítico de pequenas células/leucemia linfocítica crónica (SLL/LLC), linfoma de células do manto (LCM), linfoma folicular (LF), linfoma da células B grande difusa (LCGD), linfoma de zona marginal (LZM), leucemia células pilosas (LCP) e leucemia linfocítica (LPL), linfoma das células B da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado a mucosa (MALT), linfoma das células B da zona marginal nodal, linfoma de células grandes do mediastino, linfoma de células grande intravascular, linfoma de efusão primária, leucemia/linfoma linfoblástica de B precursoras, linfoma das células T e NK precursoras (linfoma linfoblástico de T precursora, linfoma blástico das células NK), tumores das células T e NK maduras, incluindo linfoma e leucemia da célula T periférica (PTL), leucemia da célula T adulta/ linfomas das célula T e leucemia linfocítica granular grande, leucemia linfocítica crónica da célula T/leucemia prolinfocítica, leucemia linfocítica granular da célula T grande, leucemia agressiva da célula NK, linfoma extranodal de células T-/NK, linfoma da célula T tipo enteropatia, linfoma hepatosplénico da célula T, linfoma anaplástico da célula grande (ALCL), linfoma angiocétrico e angioimunoblastico da célula T, micose fungoide/síndroma de Sézary, e linfoma cutâneo da célula T (CTCL). Outros cancros que podem ser tratados pelos anticorpos aqui divulgados incluem mas não são limitados a Linfoma de Hodgkin, tumores de células precursoras de linfócitos, incluindo leucemia/linfoma linfoblástico aguda das células B (B-LLA), e leucemia/linfoma linfoblástica aguda da célula T (T-LLA),

timoma, histocitose celular de Langerhans, mieloma múltiplo, neoplasias mieloides tais como leucemias mielogenas agudas (LMA), incluindo LMA com maturação, LMA sem diferenciação, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, e leucemias monocíticas agudas, sindromas mielodisplásticos, e doenças mieloproliferativas crónicas (DMC), incluindo leucemia mielogénica crónica (LMC). Outros cancros que podem ser tratáveis pelos anticorpos aqui divulgados incluem mas não são limitados a tumores do sistema nervoso central tais como glioma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma, e retinoblastoma; tumores sólidos da cabeça e pescoço (por exemplo cancro nasofaríngeo, carcinoma das glândulas salivares, e cancro esofágico), pulmão (por exemplo cancro das pequenas células do pulmão, cancro não das pequenas células pulmão, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), sistema digestivo (por exemplo cancro do estômago ou gástrico incluindo cancro gastrointestinal, cancro do duto biliar ou do trato biliar, cancro do colon, cancro retal, cancro colorectal, e carcinoma anal), sistema reprodutivo (por exemplo cancro testicular, penis, ou próstata, uterino, vaginal, vulvar, cervical, ovárico, e do endométrio), pele (por exemplo melanoma, carcinoma das células basal, cancro das células escamosas, queratose actínica), fígado (por exemplo cancro do fígado, carcinoma hepático, cancro hepatocelular, e hepatoma), ósseos (por exemplo osteoclastoma, e cancros ósseos osteolíticos), tecidos e órgãos adicionais (por exemplo cancro pancreático, cancro da bexiga, cancro do rim ou renal, cancro da tiroide, cancro da mama, cancro do peritoneu, e sarcoma de Kaposi), e tumores do sistema vascular (por exemplo angiossarcoma e hemagiopericitoma).

Indicações oncológicas preferidas que podem ser tratados pelos anticorpos anti-CD19 da invenção incluem mas não são

limitadas a todos os linfomas não Hodgkin (LNH), especialmente LNH refratária/resistente, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfooblástica aguda da célula B/linfoma (B-LLA), e linfoma de células do manto (LCM).

Resultados da autoimunidade de uma quebra da auto-tolerância envolvendo mecanismos imunitários humorais e/ou mediados por células. Entre as consequências da falha na tolerância central e/ou periférica, são a sobrevivência e ativação de células B e células T auto reativas. Várias doenças autoimunes são definidas por ativação excessiva dos linfócitos B e/ou T. A ativação destas células requerem em cooperação, o acoplamento de抗ígenio e sinais co-estimuladores dos linfócitos de interação. depleção mediada por anticorpo, inibição, anti-proliferação, e/ou bloqueamento das células B são abordagens terapêuticas para o tratamento de doença autoimune.

Por "doenças autoimunes" aqui incluem rejeição do enxerto alógénico em ilhota, alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolipídico, doença autoimune de Addison, autoanticorpos antineutrófilos citoplasmáticos (ANCA), doenças autoimunes da glândula adrenal, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimmune, miocardite autoimune, neutropenia autoimune, ooforite autoimune e orquite, trombocitopenia autoimune, urticária autoimune, doença de Behcet, penfigóide bolhoso, cardiomiopatias, Síndroma de Castleman, spruce-dermatite celíaca, síndroma disfunção imunológica de fadiga crónica, polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, síndroma de Churg-Strauss, penfigóide cicatricial, síndroma de CREST, doença aglutinina fria, doença de Crohn, dermatomiosite, lúpus discoide, crioglobulinemia mista essencial, deficiência de fator VIII, fibroialgia-fibromiosite, glomerulonefrite,

doença de Grave, Guillain-Barre, síndroma de Goodpasture, doença de enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), tiroidite de Hashimoto, hemofilia A, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatia de IgA, polineuropatias de IgM, trombocitopenia imunomediada, artrite juvenil, doença de Kawasaki, líquen plantus, lúpus eritematoso, doença de Meniere, doença mista do tecido conjuntivo, esclerose múltipla (MS), diabetes mellitus tipo 1, miastenia grave, pênfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policrondrite, síndromas poliglandular, polimialgia reumática, polimiosite e dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoriase, artrite psoriática, fenómeno de Reynaud, síndrome de Reiter, artrite reumatoide (RA), sarcoidose, escleroderma, síndrome de Sjogren, rejeição de transplante de órgão sólido, síndroma de pessoa rígida, sistema de lúpus eritematóide (SLE), arterite de Takayasu, arterite temporal/ arterite de células gigantes, púrpura trombocitopenia trombótica, colite ulcerosa, uveíte, vasculites tais como vasculite dermatite herpetiforme, vitiligo, e granulomatose de Wegener.

Indicações autoimunes preferidas que podem ser tratadas pelos anticorpos anti-CD19 da invenção incluem mas não são limitados a artrite reumatoide (RA), sistema de lúpus eritematóide (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

Por "distúrbios inflamatórios" aqui incluem-se síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), artrite sética aguda, artrite adjuvante, artrite ideopática juvenil, encefalomielite alérgica, rinite alérgica, vasculite alérgica, alergia, asma, aterosclerose, inflamação crónica devida a infecções crónicas virais ou bacterianas, doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), doença da artéria

coronária, encefalite, doença inflamatória intestinal, osteólise inflamatória, inflamação associada a reações de hipersensibilidade aguda e retardada, inflamação associada com tumores, lesão do nervo periférico ou doenças desmielinizantes, inflamação associada com trauma tecidual tais como queimaduras e isquémia, inflamação devida a meningite, síndrome de lesão de órgãos múltiplos, fibrose pulmonar, sepse e choque séptico, síndroma de Stevens-Johnson, artropatia indiferenciada, e espondiloartropatia indiferenciada.

Por "doenças infeciosas" aqui incluem-se doenças causadas por patogénios tais como vírus, bactérias, fungos, protozoários, e parasitas. As doenças infeciosas podem ser causadas por vírus incluindo adenovírus, citomegalovírus, dengue, Epstein-Barr, hanta, hepatite A, hepatite B, hepatite C, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, vírus da imnodeficiência humana, (HIV), papiloma vírus humano (HPV), gripe, sarampo, papeira, papova vírus, polio, vírus sincicial respiratório, peste bovina, rinovírus, rotavírus, rubéola, vírus SARS, varíola, meningite vírica, e afins. As doenças infeciosas podem também ser causadas por bactérias incluindo *Bacillus antracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Diphtheria*, *E. coli*, *Legionella*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium rickettsia*, *Mycoplasma neisseria*, *Pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumonia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Vibria cholerae*, *Yersinia pestis*, e afins. As doenças infeciosas podem também ser causadas por fungos tais como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium mameeffei*, e afins. As doenças infeciosas podem também ser causadas por

protozoários e parasitas tais como clamídia, kokzidioa, leishmania, malaria, rickettsia, tripanosomas, e afins.

Além disso, os anticorpos como aqui divulgado podem ser usados para prevenir ou tratar condições adicionais incluindo mas não limitado a condições cardíacas tais como insuficiência cardíaca congestiva (CHF), miocardite e outras condições de miocardio; doenças da pele tais como rosácea, acne, e eczema; condições ósseas e dentárias tais como perda de osso, osteoporose, doença de Paget, histiocitose de células de Langerhans, doença periodontal, osteopénia por desuso, osteomalacia, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa poliostótica, metástase óssea, tratamento da dor óssea, hipercalcemia maligna humorai, reconstrução periodontal, lesão da medula espinhal, e fraturas ósseas; condições metabólicas tais como doença de Gaucher; condições endocrinias tais como síndroma de Cushing; e condições neurológicas.

Um certo número de receptores que podem interagir com os anticorpos da presente invenção, são polimórficos na população humana. Para um dado doente ou população de doentes, a eficácia dos anticorpos da presente invenção pode ser afetada pela presença ou ausência de polimorfismo específico nas proteínas. Por exemplo, Fc γ RIIA é polimórfico na posição 158, o qual é comumente ou V (alta afinidade) ou F (baixa afinidade). Foi observado que os doentes com o genótipo V/V homozigótico têm uma melhor resposta clínica ao tratamento com o anticorpo anti-CD20 Rituxan® (rituximab), provavelmente porque estes doentes fazem uma resposta NK mais forte (Dall'Ozzo et al. (2004) Cancer Res. 64:4664-9). Polimorfismos adicionais incluem mas não são limitados a Fc γ RIIA R131 ou H131, e esses polimorfismos são conhecidos por aumentarem ou diminuírem a ligação Fc e subsequente a atividade biológica, dependendo

do polimorfismo dos anticorpos como aqui descritos podem ligar preferencialmente a uma forma polimórfica particular de um recetor, por exemplo Fc γ RIIIA 158 V, ou ligam-se com uma afinidade equivalente a todos os polimorfismos na posição particular no recetor, por exemplo ambos os polimorfismos 158V e 158F de Fc γ RIIIA. Preferencialmente os anticorpos como aqui divulgados podem ter ligação equivalente a polimorfismos e podem ser usados num anticorpo para eliminar a eficácia diferencial observada nos doentes com diferentes polimorfismos. Uma tal propriedade pode dar uma maior coerência na resposta terapêutica e reduzir as populações de pacientes que não respondem. Essa variante Fc com idêntica ligação a polimorfismos recetores pode ter atividade biológica aumentada, tais como CMCA, CDC ou meia vida de circulação, ou em alternativa atividade diminuída, através da modulação da ligação aos recetores Fc relevantes. Os anticorpos como aqui divulgados podem ligar-se com maior ou menor afinidade a um dos polimorfismos de um recetor, ou acentuando a diferença existente ligando ou invertendo a diferença. Uma tal propriedade pode permitir a criação de terapêuticas especialmente adaptadas para a eficácia com uma população doente possuindo tal polimorfismo. Por exemplo, uma população doente possuindo um polimorfismo com um maior afinidade para um recetor inibitório tal como Fc γ RIIB pode receber um fármaco contendo um anticorpo com ligação reduzida para tal forma polimórfica do recetor, criando um fármaco com maior eficácia.

Preferencialmente os doentes são triados para um ou mais polimorfismos com vista a predizer a eficácia dos anticorpos da presente invenção. Esta informação pode ser usada, por exemplo, para selecionar doentes para incluir ou excluir de ensaios clínicos ou, pós-aprovação, para fornecer orientações aos médicos e doentes visando dosagens

apropriadas e opções de tratamento. Por exemplo, em doentes que são homozigóticos ou heterozigóticos para fármacos de anticorpo Fc γ RIIA 158F tal como o anti-CD20 mAb, Rituximab são minimamente eficazes (Carton 2002 Blood 99: 754-758; Weng 2003 J. Clin. Oncol. 21: 3940-3947); tais doentes podem mostrar uma melhor resposta clínica aos anticorpos da presente invenção. Os doentes podem ser selecionados para inclusão em ensaios clínicos para um anticorpo da presente invenção se o seu genótipo indica que eles são suscetíveis de responder significativamente melhor a um anticorpo da presente invenção, em comparação com um ou mais terapêuticas de anticorpos atualmente utilizados. Dosagens apropriadas e regimes de tratamento podem ser determinados usando essa informação do genótipo. Os doentes podem ser selecionados para inclusão num ensaio clínico ou para a recepção de terapia pós-aprovação com base no seu genótipo de polimorfismo, onde tal terapia contém um anticorpo manipulado para ser especificamente eficaz para essa população, ou em alternativa onde tal terapia contém um anticorpo que não mostra atividade diferencial para as formas diferentes do polimorfismo.

São aqui divulgados testes de diagnóstico para identificar doentes que são igualmente para mostrar uma resposta clínica favorável para um anticorpo da presente invenção, ou que são igualmente para exibir uma resposta significativamente melhor quando tratados com um anticorpo da presente invenção versus uma ou mais terapêuticas de anticorpo correntemente usadas. Qualquer um de uma série de métodos conhecidos na técnica podem ser usados para determinar os polimorfismos de Fc γ R em humanos.

Também divulgados são testes de prognóstico que podem ser realizados em amostras clínicas tais como sangue e amostras de tecido. Esses testes podem ser ensaiados para a

atividade da função efetora, incluindo mas não limitado a CMCA, CDC, fagocitose, e opsonização, ou para matar, independentemente do mecanismo, de células cancerosas ou patogénicas de outro modo. Preferencialmente os ensaios CMCA, tal como os descritos previamente, são usados para prever, para um doente específico, a eficácia de um dado anticorpo da presente invenção. Essa informação pode ser usada para identificar doentes para inclusão ou exclusão nos ensaios clínicos, ou para consubstanciar decisões sobre dosagens apropriadas e regimes de tratamento. Essa informação pode também ser usada para selecionar um fármaco que contém um anticorpo particular que mostra superior atividade nesse ensaio.

Formulação

São divulgadas composições farmacêuticas em que anticorpos da presente invenção e um ou mais agentes terapeuticamente ativos são formulados. As formulações dos anticorpos da presente invenção são preparadas para armazenamento por mistura do referido anticorpo com o desejado grau de pureza com transportadores, excipientes ou estabilizantes opcionais farmaceuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed., 1980), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Transportadores, excipientes, ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para recipientes nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, acetato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilo amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool orbenzil butílico; alquil parabenos tais como as metil ou propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol);

polipéptidos de baixo peso molecular (menos que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açucares tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; adoçantes e outros agentes aromatizantes; enchimentos tais como celulose microcristalina, lactose, milho e outros amidos; agentes ligantes; aditivos; agentes de coloração; formadores de sais contraiões tais como sódio; complexos de metal (por exemplo complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iónicos tais como TWEENTM, PLURONICSTM ou polietileno glicol (PEG). A composição farmacêutica que compreende o anticorpo da presente invenção pode estar numa forma solúvel em água, tal como estar presente como sais farmaceuticamente aceitáveis, os quais se entende incluem tanto os sais de adição de ácidos e bases. "Sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis" referem-se aos sais que retêm a eficiência biológica de bases livres e que não são biologicamente ou de outro modo indesejáveis, formados com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido hidrobrómico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e afins, e ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanesulfônico, ácido etanesulfônico, ácido p-toluenesulfônico, ácido salicílico e afins. "Sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis" incluem os derivados de bases inorgânicas tais como sais de sódio, potássio, lítio, amónio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, alumínio e afins.

Particularmente preferidos são os sais de amónio, potássio, sódio, cálcio, e magnésio. Sais derivados de bases orgânicas não tóxicas farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de aminas primárias, secundárias, e terciárias, aminas substituídas incluindo aminas substituídas que ocorrem naturalmente, aminas cíclicas e resinas básicas de troca iônica, tais como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, e etanolamina. As formulações a usar para administração *in vivo* são preferencialmente estéreis. Isto é prontamente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis ou outros métodos.

Os anticorpos aqui divulgados podem também ser formulados como imunoliposomas. Um liposoma é uma vesícula pequena compreendendo vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensoativos que são úteis na aplicação de um agente terapêutico a um mamífero. Os liposomas que contêm o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, tais como descrito em Epstein et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030; US 4,485,045; US 4,544,545; e PCT WO 97/38731. Os liposomas com tempo de circulação melhorado são divulgados na US 5,013,556. Os componentes do liposoma são comumente dispostos numa formação em bicamada, similar à disposição das membranas biológicas. Liposomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina PEG-derivatizada (PEG-PE). Os liposomas são extrusados através de filtros de tamanho de poro definido para produzir liposomas com o diâmetro desejado. Um agente quimioterapêutico ou outro agente terapeuticamente ativo está opcionalmente contido no

liposoma (Gabizon et al., 1989, J National Cancer Inst 81:1484).

O anticorpo e outros agentes terapeuticamente ativos podem também ser acondicionados em microcápsulas preparadas por métodos incluindo mas não limitados a técnicas de coacervação, polimerização interfacial (por exemplo usando hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina, ou microcápsulas de poli-(metilmetacílato)), sistemas de administração de fármaco coloidal (por exemplo, liposomas, microsferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas), e macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edição, Osol, A. Ed., 1980. Podem ser preparadas preparações de liberação sustentada. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímero sólido hidrofóbico, as quais matrizes são na forma de artigos moldados, por exemplo filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou álcool poli(vinílico), polilactidos (US 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato, não degradável etileno acetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico degradável-ácido glicólico tais como o Lupron Depot® (os quais são microsferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, e ProLease® (disponível comercialmente da Alkermes), o qual é um sistema de aplicação à base de microsferas composto da desejada molécula bioativa incorporada numa matriz de poli-DL-láctido-co-glicolido (PLG).

Administração

A administração de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo da presente invenção, pode ser feita numa diversidade de modos, incluindo, mas não limitado a por via oral, subcutânea, intravenosa, intranasal, intraotica, transdérmica, tópica (por exemplo, géis, pomadas, loções, cremes, etc.), por via intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parentérica, retal, ou intraocular. Em alguns casos, por exemplo para o tratamento de feridas, inflamação, etc., o anticorpo pode ser diretamente aplicado como uma solução ou spray. Como é conhecido na técnica, a composição farmacêutica pode ser formulada em conformidade, dependendo da forma de introdução.

A administração subcutânea pode ser preferível em algumas circunstâncias porque o doente pode auto administrar a composição farmacêutica. Muitas terapêuticas de proteína não são suficientemente potentes para permitir a formulação de uma dose terapeuticamente eficaz no volume máximo aceitável para administração subcutânea. Este problema pode ser tratado em parte pelo uso de formulações proteicas compreendendo arginina-LCP, histidina, e polisorbato (ver WO 04091658). Os anticorpos da presente invenção podem ser mais adequados para administração subcutânea devido a, por exemplo, potencia aumentada, meia vida sérica melhorada, ou solubilidade aumentada.

Como é conhecido na técnica, as terapêuticas de proteína são muitas vezes administradas por infusão IV ou bólus. Os anticorpos da presente invenção podem também ser aplicados usando esse método. Por exemplo, a administração venosa pode ser por infusão intravenosa com 0,9% de cloreto de sódio como veículo de infusão.

A administração pulmonar pode ser conseguida utilizando um inalador ou nebulizador e a formulação compreendendo um agente de formação de aerossóis. Por exemplo, pode ser usada tecnologia para inalação AERx® comercialmente disponível da Aradigm, ou sistema de administração pulmonar Inhance™ comercialmente disponível da Nektar Therapeutics. Os anticorpos da presente invenção podem ser mais adaptados a administração intrapulmonar. O FcRn está presente no pulmão, e pode promover o transporte do pulmão para a corrente sanguínea (por exemplo Syntonix WO 04004798, Bitonti et al. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101:9763-8). Consequentemente, os anticorpos que ligam FcRn mais eficientemente no pulmão ou que são libertados mais eficientemente na circulação sanguínea podem ter biodisponibilidade melhorada a seguir à administração intrapulmonar. Os anticorpos da presente invenção podem também ser mais favoráveis para administração intrapulmonar devido a, por exemplo, solubilidade melhorada ou ponto isoelétrico alterado.

Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser mais favoráveis para aplicação oral devido a, por exemplo, estabilidade melhorada a pH gástrico e resistência à proteólise aumentada. Além disso, FcRn parece ser expresso no epitélio intestinal de adultos (Dickinson et al. (1999) J. Clin. Invest. 104:903-11), portanto anticorpos da presente invenção com perfis de interação FcRn melhorados podem mostrar biodisponibilidade aumentada a seguir a administração oral. O transporte mediado por FcRn de anticorpos pode também ocorrer noutras membranas mucosas tais como as dos tratos gastrointestinal, respiratório, e genital (Yoshida et al. (2004) Immunity 20:769-83).

Além disso, uma quantidade de sistemas de administração são conhecidos na técnica e podem ser usados para administrar

os anticorpos da presente invenção. Exemplos incluem, mas não são limitados a, encapsulação em liposomas, micropartículas, microesferas (por exemplo microesferas PLA/PGA), e afins. Em alternativa, pode ser usado um implante de um material poroso, não poroso, ou gelatinoso, incluindo membranas ou fibras. Sistemas de libertação sustentada podem compreender um material ou matriz polimérico tal como poliésteres, hidrogéis, álcool poli(vinílico), polilactidos, copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-glutamato, acetato de etilenovinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tais como os da Lupron Depot®, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. É também possível administrar um ácido nucleico que codifica o anticorpo da corrente invenção, por exemplo por infecção retroviral, injeção direta, ou revestimento com lípidos, recetores de células de superfície, ou outros agentes de transfeção. Em todos os casos, sistemas de libertação controlada podem ser usados para libertar o anticorpo no ou perto do local de ação desejado.

Dosagem

As quantidades de dosagem e a frequência de administração são, preferencialmente, selecionadas para serem terapeuticamente ou profilaticamente eficazes. Como é conhecido na técnica, os ajustes à degradação da proteína, libertação sistémica versus libertação localizada, e taxa da síntese de nova protéase, assim como a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação fármaco e a gravidade da condição pode ser necessária, e será determinável com a experimentação de rotina pelos especialistas na técnica.

A concentração do anticorpo terapeuticamente ativo na formulação pode variar desde cerca de 0,1 até 100 % em

peso. Preferencialmente, a concentração do anticorpo é numa gama de 0,003 to 1,0 molar. Com vista a tratar o doente, pode ser administrada uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo da presente invenção. Por "dose terapeuticamente eficaz" aqui entende-se uma dose que produz os efeitos para os quais é administrado. A dose exata irá depender do objetivo do tratamento, e será ajustável por um especialista na técnica usando técnicas conhecidas. As dosagens podem variar desde 0,0001 até 100 mg/kg de peso corporal ou maior, por exemplo 0,1, 1, 10, ou 50 mg/kg de peso corporal, com 1 até 10mg/kg sendo preferido.

Em alguns casos apenas uma única dose do anticorpo é usada. Em outros casos, são administradas doses múltiplas do anticorpo. O tempo decorrido entre administrações pode ser menos que 1 hora, cerca de 1 hora, cerca de 1-2 horas, cerca de 2-3 horas, cerca de 3-4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 2-4 dias, cerca de 4-6 dias, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, ou mais que 2 semanas.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados em regimes de dosagem metronómica, quer por infusão contínua ou administração frequente em períodos de repouso prolongado. Tal administração metronómica pode envolver dosagem com intervalo constante sem períodos de repouso. Tipicamente esses regimes englobar dose baixa crónica ou infusão contínua por um período de tempo prolongado, por exemplo 1-2 dias, 1-2 semanas, 1-2 meses, ou até 6 meses ou mais. O uso de doses menores pode minimizar efeitos secundários e a necessidade de períodos de repouso.

Em certos casos o anticorpo da presente invenção e um ou mais de outros agentes profiláticos ou terapêuticos são administrados ciclicamente ao doente. O ciclo terapêutico

envolve a administração de um primeiro agente de uma só vez, um segundo agente a uma segundo tempo, opcionalmente agentes adicionais a tempos adicionais, opcionalmente um período de descanso, e depois repetir esta sequência de administração de um ou mais tempos. O número de ciclos é tipicamente desde 2 - 10. O ciclo terapêutico pode reduzir o desenvolvimento de resistência a um ou mais agentes, pode minimizar os efeitos secundários, ou pode melhorar a eficácia de tratamento.

Terapias de combinação

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados concomitantemente com um ou mais de outros regimes ou agentes terapêuticos. Regimes ou agentes terapêuticos adicionais podem ser usados para melhorar a eficácia ou a segurança do antícorpo. Também, os regimes ou agentes terapêuticos adicionais podem ser usados para tratar a mesma doença ou uma co-morbidade em vez de alterar a ação do antícorpo. Por exemplo, um antícorpo da presente invenção pode ser administrado ao doente juntamente com quimioterapia, terapia de radiação, ou a quimioterapia e a terapia de radiação. O antícorpo da presente invenção pode ser administrado em combinação com um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos, incluindo mas não limitado a agentes citotóxicos, agentes quimioterapêuticos, citocinas, agentes inibidores de crescimento, agentes anti-hormonais, inibidores de quinase, agentes antiangiogénicos, cardioprotetores, agentes imunoestimulantes, agentes imunosupressores, agentes que promovem a proliferação de células hematológicas, inibidores da angiogénese, inibidores da proteína tirosina quinase (PTK), anticorpos adicionais, Fc γ RIIb ou outros inibidores de recetor Fc, ou outros agentes terapêuticos.

Os termos "em combinação com" e "coadministração" não são limitados à administração dos agentes profiláticos ou terapêuticos exatamente ao mesmo tempo. Em vez disso, entende-se que o anticorpo da presente invenção e o outro agente ou agentes são administrados numa sequência e no tempo do intervalo de modo que eles podem atuar em conjunto para fornecer um benefício que é aumentado versus tratamento com apenas um ou outro anticorpo da presente invenção ou o outro agente ou agentes. É preferível que o anticorpo e o outro agente ou agentes atuam aditivamente, e é especialmente preferido que atuem sinergicamente. Essas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o fim pretendido. O prático clínico especialista pode determinar empiricamente, ou considerando as farmacocinéticas e modos de ação dos agentes, a dose ou doses apropriadas de cada agente terapêutico, assim como os timings e métodos de administração apropriados.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados com uma ou mais moléculas adicionais compreendendo anticorpos ou Fc. Os anticorpos da presente invenção podem ser coadministrados com um ou mais outros anticorpos que têm eficácia no tratamento da mesma doença ou numa comorbilidade adicional; por exemplo podem ser administrados dois anticorpos que reconhecem dois抗ígenos que são sobre expressados num dado tipo de cancro, ou dois抗ígenos que medeiam a patogénese de uma doença autoimune ou infeciosa.

Exemplos de anticorpos anticancro que podem ser coadministrados incluem, mas não são limitados a, anticorpos antígenos de superfície de células anti-17-1A tais como Panorex™ (edrecolomab); anticorpos anti-4-1BB; anticorpos anti-4Dc; anticorpos anti-A33 tais como A33 e

CDP-833; anticorpos anti- $\alpha 4\beta 1$ integrina tais como natalizumab; anticorpos anti- $\alpha 4\beta 7$ integrina tais como LDP-02; anticorpos anti- $\alpha V\beta 1$ integrina tais como F-200, M-200, e SJ-749; anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ integrina tais como abciximab, CNTO-95, Mab-17E6, e Vitaxin™; anticorpos fator 5 (C5) anti complemento tais como 5G1.1; anticorpos anti-CA125 tais como OvaRex® (oregovomab); anticorpos anti-CD3 tais como Nuvion® (visilizumab) e Rexomab; anticorpos anti-CD4 tais como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A; anticorpos anti-CD6 tais como Oncolisina B e Oncolisina CD6; anticorpos anti-CD7 tais como HB2; anticorpos anti-CD19 tais como B43, MT-103, e Oncolisina B; anticorpos anti-CD20 tais como 2H7, 2H7.v16, 2H7.v114, 2H7.v115, Bexxar® (tositumomab, I-131 marcado anti-CD20), Rituxan® (rituximab), e Zevalin® (Ibritumomab tiuxetan, Y-90 marcado anti-CD20); anticorpos anti-CD22 tais como Lymphocide™ (epratuzumab, Y-90 marcado anti-CD22); anticorpos anti-CD23 tais como IDEC-152; anticorpos anti-CD25 tais como basiliximab e Zenapax® (daclizumab); anticorpos anti-CD30 tais como AC10, MDX-060, e SGN-30; anticorpos anti-CD33 tais como Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicina), Oncolisina M, e Smart M195; anticorpos anti-CD38; anticorpos anti-CD40 tais como SGN-40 e toralizumab; anticorpos anti-CD40L tais como 5c8, Antova™, e IDEC-131; anticorpos anti-CD44 tais como bivatuzumab; anticorpos anti-CD46; anticorpos anti-CD52 tais como Campath® (alemtuzumab); anticorpos anti-CD55 tais como SC-1; anticorpos anti-CD56 tais como huN901-DM1; anticorpos anti-CD64 tais como MDX-33; anticorpos anti-CD66e tal como XR-303; anticorpos anti-CD74 tais como IMMU-110; anticorpos anti-CD80 tais como galiximab e IDEC-114; anticorpos anti-CD89 tais como MDX-214; anticorpos anti-CD123; anticorpos anti-CD138 tais como B-B4-DM1; anticorpos anti-CD146 tais como AA-98; anticorpos anti-CD148; anticorpos anti-CEA tais como cT84.66, labetuzumab, e Pentacea™; anticorpos anti-CTLA-4 tais como MDX-101;

anticorpos anti-CXCR4; anticorpos anti-EGFR tais como ABX-EGF, Erbitux® (cetuximab), IMC-C225, e Merck Mab 425; anticorpos anti-EpCAM tais como anti-EpCAM de Crucell, ING-1, e IS-IL-2; anticorpos anti-efrina B2/EphB4; anticorpos anti-Her2 tais como Herceptin®, MDX-210; anticorpos anti-FAP (proteína de ativação de fibroblastos) tais como sibrotuzumab; anticorpos anti-ferritina tais como NXT-211; anticorpos anti-FGF-1; anticorpos anti-FGF-3; anticorpos anti-FGF-8; anticorpos anti-FGFR, anticorpos anti-fibrina; anticorpos anti-G250 tais como WX-G250 e Rencatex®; anticorpos gangliósido anti-GD2 tais como EMD-273063 e TriGem; anticorpos anti-GD3 gangliósido tais como BEC2, KW-2871, e mitumomab; anticorpos anti-gpIIb/IIIa tais como ReoPro; anticorpos antiheparinase; anticorpos anti-Her2/ErbB2 tais como Herceptin® (trastuzumab), MDX-210, e pertuzumab; anticorpos anti-HLA tais como Oncolym®, Smart 1D10; anticorpos anti-HM1.24; anticorpos anti-ICAM tais como ICM3; anticorpos receptores anti-IgA; anticorpos anti-IGF-1 tais como CP-751871 e EM-164; anticorpos anti-IGF-1R tais como IMC-A12; anticorpos anti-IL-6 tais como CNTO-328 e elsilimomab; anticorpos anti-IL-15 tais como HuMax™-IL15; anticorpos anti-KDR; anticorpos anti-laminina 5; anticorpos de抗原 anti-Lewis Y tais como Hu3S193 e IGN-311; anticorpos anti-MCAM; anticorpos anti-Muc1 tais como BravaRex e TriAb; anticorpos anti-NCAM tais como ERIC-1 e ICRT; anticorpos antigénio anti-PEM tais como Theragyn e Therex; anticorpos anti-PSA; anticorpos anti-PSCA tais como IG8; anticorpos anti-Ptk; anticorpos anti-PTN; anticorpos anti-RANKL tais como AMG-162; anticorpos anti-RLIP76; anticorpos antigénio anti-SK-1 tais como Monopharm C; anticorpos anti-STEAP; anticorpos anti-TAG72 tais como CC49-SCA e MDX-220; anticorpos anti-FCT-β tais como CAT-152; anticorpos anti-TNF-α tais como CDP571, CDP870, D2E7, Humira® (adalimumab), e Remicade® (infliximab); anticorpos anti-TRAIL-R1 e TRAIL-R2; anticorpos anti-VE-cadherin-2; e

anticorpos anti-VLA-4 tais como Antegren™. Para além disso, anticorpos anti-idiotípico incluindo mas não limitados a epitopo GD3 de anticorpo BEC2 e o epitopo gp72 de anticorpo 105AD7, podem ser usados. Além disso, anticorpos biespecíficos incluindo mas não limitados ao anticorpo Bi20 anti-CD3/CD20 podem ser usados.

Exemplos de anticorpos que podem ser coadministrados para tratar doenças autoimune ou inflamatória, rejeição de transplante, GVHD, e afins incluem, mas não são limitados a, anticorpos integrina anti- $\alpha 4\beta 7$ tais como LDP-02, anticorpos integrina anti-beta2 tais como LDP-01, anticorpos anti-complemento (C5) tais como 5G1.1, anticorpos anti-CD2 tais como BTI-322, MEDI-507, anticorpos anti-CD3 tais como OKT3, SMART anti-CD3, anticorpos anti-CD4 tais como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticorpos anti-CD11a, anticorpos anti-CD14 tais como IC14, anticorpos anti-CD18, anticorpos anti-CD23 tais como IDEC 152, anticorpos anti-CD25 tais como Zenapax, anticorpos anti-CD40L tais como 5c8, Antova, IDBC-131, anticorpos anti-CD64 tais como MDX-33, anticorpos anti-CD80 tais como IDEC-114, anticorpos anti-CD147 tais como ABX-CBL, anticorpos anti-E-seletina tais como CDP850, anticorpos anti-gpIIb/IIIa tais como ReoPro/Abcixima, anticorpos anti-ICAM-3 tais como ICM3, anticorpos anti-ICE tais como VX-740, anticorpos anti-FcyR1 tais como MDX-33, anticorpos anti-IgE tais como rhuMab-E25, anticorpos anti-IL-4 tais como SB-240683, anticorpos anti-IL-5 tais como SB-240563, SCH55700, anticorpos anti-IL-8 tais como ABX-IL8, anticorpos anti-interferão gama, e anticorpos anti-TNF α tais como CDP571, CDR870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, anticorpos anti-VLA-4 tais como Antegren. Exemplos de outras moléculas contendo Fc que podem ser coadministrados para tratar doença autoimune ou inflamatória, rejeição de transplante, GVHD, e afins incluem, mas não são limitados a, recetor p75 TNF

/fusão de Fc Enbrel® (etanercept) e armadilha IL-1 da Regeneron.

Exemplos de anticorpos que podem ser coadministrados para tratar doenças infeciosas incluem, mas não são limitados a, anticorpos anti-antrax tais como ABthrax, anticorpos anti-CMV tais como CytoGam e sevirumab, anticorpos anti-cryptosporídio tais como CryptoGAM, Sporidin-G, anticorpos anti-helicobacter tais como Pyloran, anticorpos anti-hepatite B tais como HepeX-B, Nabi-HB, anticorpos anti-HIV tais como HRG-214, anticorpos anti-RSV tais como felvizumab, HNK-20, palivizumab, RespiGam, e anticorpos anti-staphylococcus tais como Aurexis, Aurograb, BSYX-A110, e SE-Mab.

Em alternativa, os anticorpos da presente invenção podem ser coadministrados ou com uma ou mais outras moléculas que compete para a ligação a um ou mais receptores Fc. Por exemplo, coadministrar inibidores do Fc γ RIIb recetor inibidor pode resultar na função efetora aumentada. De modo semelhante, a coadministração de inibidores dos receptores de ativação tais como Fc γ RIIIa podem minimizar a função efetora não desejada. Os inibidores de recetor Fc incluem, mas não são limitados a, moléculas Fc que são manipuladas para atuar como inibidores competitivos para ligar a Fc γ RIIb Fc γ RIIIa, ou outros receptores Fc, assim como outras imunoglobulinas e especificamente o tratamento chamado IVIg (imunoglobulina intravenosa). O inibidor pode ser administrado e permitir atuar antes do anticorpo ser administrado. Uma via alternativa para atingir o efeito de doseamento sequencial deve ser fornecer uma forma de dosagem de libertação imediata do inibidor recetor Fc e depois uma formulação de libertação sustentada do anticorpo da invenção. As formulações de libertação imediata e de libertação controlada podem ser administrados separadamente

ou ser combinados numa forma de unidade de dosagem. A administração de um inibidor FcγRIIb pode também ser usado para limitar respostas imunes não desejadas, por exemplo resposta a anticorpo anti-Fator VIII a seguir a administração do Fator VIII a hemofílicos.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados com um agente quimioterapêutico. Por "agente quimioterapêutico" como aqui usado entende-se um composto químico útil no tratamento de cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem mas não são limitados a agentes de alquilação tais como tiotepa e ciclosfosfamida (CYTOXANTM); sulfonatos de alquilo tais como busulfano, improsulfano e piposulfano; androgénios tais como calusterona, dromostanolona propionato, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; antiandrogénios tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina; antibióticos tais como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodoxicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antiestrogénios incluindo por exemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles de inibiçao de aromatase, 4-hifroxitamoxifeno, trioxifeno, quetoxifeno oxifeno, LY 117018, onapristona, e toremifeno (Fareston); antimetabolitos tais como metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; aziridinas tais

como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosfaoramida e trimetilolomelamina; reposidores de ácido fólico tais como ácido frolínico; mostardas de azoto tais como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mustarda uracilo; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; proteínas tais como arginina deiminase e asparaginase; análogos da purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamicrina, tioguanina; análogos pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; taxanos, por exemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) e docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); RFS 2000 inibidor de topoisomerase; inibidor da timidilato sintase (tais como Tomudex); quimioterapêuticos adicionais incluindo aceglatona; glicósido alhofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; difluorometilornitina (DMFO); elformitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de gálio; hifroxiureia; lentinana; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mepidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofurano; espirogermânio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa;

clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; ácido retinóico; esperamicinas; capecitabina. Sais, ácidos ou derivados, farmaceuticamente aceitáveis, de qualquer dos acima podem também ser usados.

Um quimioterapêutico ou outro agente citotóxico podem ser administrados como pró-fármaco. Por "pró-fármaco" como aqui usado entende-se um precursor ou forma derivada de uma substância farmaceuticamente ativa ou seja menos citotoxicidade para células tumorais em comparação com o fármaco parente e é capaz de ser ativado enzimaticamente ou convertido numa forma parente mais ativa. Ver, por exemplo Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615° Meeting Belfast, 14:375-382; Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery; e Borchardt et al., (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. Os pró-fármacos que podem encontrar uso com a presente invenção incluem mas não são limitados a pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo péptido, pró-fármacos modificados com D-aminoácido, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo beta-lactâmicos, pró-fármacos contendo opcionalmente fenoxiacetamida substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco citotóxico mais ativo isento de citotoxicidade. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivatizados numa forma de pró-fármaco para uso com os anticorpos da presente invenção incluem mas não são limitados a qualquer dos agentes quimioterapêuticos acima mencionados.

Uma diversidade de outros agentes terapêuticos podem encontrar utilização para administração com os anticorpos da presente invenção. O anticorpo é administrado com um agente anti-angiogénico. Por "agente anti-angiogénico" como aqui usado entende-se um composto que bloqueia, ou interfere em algum grau, no desenvolvimento dos vasos sanguíneos. O fator anti-angiogénico pode, por exemplo, ser uma molécula pequena ou uma proteína, por exemplo um anticorpo, fusão Fc, ou citocina, que liga a um fator de crescimento ou receptor de fator de crescimento envolvido na promoção da angiogénesis. O fator anti-angiogénico preferido aqui é um anticorpo que se liga ao Fator de Crescimento Vascular Endotelial (FCVE). Outros agentes que inibem a sinalização através de FCVE podem também ser usados, por exemplo terapêuticos à base de RNA que reduzem os níveis de FCVE ou a expressão de FCVE-R, fusões da toxina FCVE, ratoeira de FCVE Regeneron, e anticorpos que ligam FCVE-R. Em alternativa, o anticorpo pode ser administrado com um agente terapêutico que induz ou aumenta a resposta adaptativa imunológica, por exemplo um anticorpo que visa CTLA-4. Agentes anti-angiogéneses adicionais incluem, mas não são limitados a, angiostatina (fragmento de plasminogénio), antitrombina III, angiozima, ABT-627, Bay 12-9566, benefina, bevacizumab, bisfosfonatos, BMS-275291, inibidor derivado de cartilagem (CDI), CAI, CD59 fragmento de complemento, CEP-7055, Col3, combretastatina A-4, endostatina (fragmento colagénio XVIII), inibidores da farnesil transferase, fragmento de fibronetina, gro-beta, halofuginona, heparinases, fragmento de exassacáridos heparina, HMV833, gonadotropina coriónica humana (hCG), IM-862, interferão alfa, interferão beta, interferão gama, proteína indutível por interferão 10 (IP-10), interleucina-12, kringle 5 (fragmento de plasminogénio), marimastato, inibidores da metaloproteinase (por exemplo TIMPs), 2-metodiestradiol, MMI 270 (CGS 27023A), inibidor de

ativiator de plasminogénio (PAI), fator-4 plaquetário (PF4), prinomastato, fragmento de prolactina 16kDa, proteína relacionada com proliferina (PRP), PTK 787/ZK 222594, retinoides, solimastato, esqualamina, SS3304, SU5416, SU6668, SU11248, tetrahidrocortisol-s, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina-1 (TSP-1), TNP-470, transformação do fator de crescimento beta (FCT- β), vasculostatina, vasostatina (fragmento de calreticulina), ZS6126, e ZD6474.

Preferencialmente, o anticorpo é administrado com um inibidor da tirosina quinase. Por "inibidor da tirosina quinase" como aqui usado entende-se uma molécula que inibe em alguma extensão a atividade da tirosina quinase de uma tirosina quinase. Exemplos desses inibidores incluem mas não são limitados a quinazolinas, tais como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tais como CGP 59326, CGP 60261 e CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo(2,3-d) pirimidinas; curcumina (metano diferuloílo, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas contendo porções nitrotiofeno; PD-01 83805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por exemplo as que se ligam a ácido nucleico codificando ErbB); quinoxalinas (US 5,804,396); trifostinas (US 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); inibidores de pan-ErbB tais como C1-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Mesilato de imatiniba (ST1571, Gleevec®; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); C1-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); ou como descrito em qualquer dos seguintes pedidos de patente: US 5,804,396; PCT WO 99/09016 (American Cyanimid); PCT WO 98/43960 (American Cyanamid); PCT WO

97/38983 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert); PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc); PCT WO 96/33978 (AstraZeneca); PCT WO 96/3397 (AstraZeneca); PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), gefitinib (IRESSA™, ZD1839, AstraZeneca), e OSI-774 (Tarceva™, OSI Pharmaceuticals/Genentech).

O anticorpo pode também ser administrado com um ou mais agentes imunomoduladores. Tais agentes podem aumentar ou diminuir a produção de uma ou mais citocinas, apresentação auto-antigénio regulado para cima ou para baixo, antigénios máscara de MHC, ou promove a proliferação, diferenciação, migração, ou estado de ativação de uma ou mais tipos de células imunitárias. Agentes imunomoduladores incluem mas não limitados a: fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) tais como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, indometacina, cеторалако, oxaprozina, nabumentona, sulindaco, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, cetoprofeno, e nabumetona; esteroides (por exemplo glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidroxicortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, trimcinolona, azulfidineicosanoides tais como prostaglandinas, tromboxanos, e leucotrienos; assim como esteroides tópicos tais como antralina, calcipotrieno, clobetasol, e tazaroteno); citocinas tais como TGF β , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10; citocina, quemocina, ou antagonistas de recetor incluindo anticorpos, recetores solúveis, e fusões recetor Fc contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, fatores de complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFN α , IFN β , IFN γ , IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9 IL-12, IL-13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, seletinas, TGF β , TNF α , TNF β , TNF-R1, recetor

da célula T, incluindo Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab), e Remicade® (infliximab); heterólogos globulina anti-limfocito; outras moléculas imunomoduladoras tais como pirimidinas substituídas 2-amino-6-aryl-5, anticorpos anti-idiotípicos para péptidos ligado a MHC e fragmentos MHC, azatioprina, brequinar, bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-penicilamina, deoxispergualina, FK506, glutaraldeído, ouro, hifroxicloroquina, leflunomida, malononitrioloamidas (por exemplo leflunomida), metotrexato, monocíclica, mizoribina, micofenolato de mofetilo, rapamicina, e sulfasasazina.

Alternativamente os anticorpos da presente invenção podem ser administrados com uma citocina. Por "citocina" como aqui usado entende-se um termo genérico para proteínas libertadas por uma população de células que atuam noutra célula como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfoquinas, monoquinas, e hormonas polipeptídicas tradicionais. Incluído entre as citocinas estão hormonas de crescimento tais como hormonas de crescimento humanas, hormonas N-metionilo de crescimento humanas, e hormona de crescimento de bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormona glicoproteína tais como hormona de estimulação de folículo (HEF), hormona estimulante da tireoide (TSH), e hormona luteinizante (HL); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogénio placentário; fator alfa e beta de necrose tumoral; substância inibidora mülleriana; péptido associado a gonadotropina de rato; inibitina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoletina (TPO); fator de crescimento neural tal como FEC-beta; fator de crescimento plaquetário; fator de crescimento transformador (TGFs) tais como FCT-alfa e FCT-beta; fator I e II de crescimento tipo insulina;

eritropoletina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões tais como interferão-alfa, beta, e gama; fatores de estimulação de colónia (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulocitemacrófago-CSF (GM-CSF); e granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, um fator de necrose tumoral tais como TNF-alfa ou TNF-beta; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e kit ligando (KL). Como aqui usado, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes, e biologicamente ativos equivalentes das citocinas da sequência nativa.

Preferencialmente, as citocinas ou outros agentes que estimulam células do sistema imunitário são coadministrados com o anticorpo da presente invenção. Um tal modo de tratamento pode aumentar a função efetora desejada. Por exemplo, agentes que estimulam as células NK, incluindo mas não limitado a IL-2 podem ser coadministradas. Numa outra forma de realização, podem ser coadministrado os agentes que estimulam macrófagos, incluindo mas não limitado a C5a, péptidos formilo tais como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre et al. (2003) Scand. J. Immunol. 57: 221-8). Também podem ser administrados, agentes que estimulam os neutrófilos, incluindo mas não limitados a G-CSF, GM-CSF, e afins. Além disso, podem ser usados agentes que promovem a migração dessas citocinas imunoestimuladoras. Também agentes adicionais incluindo mas não limitados a interferão gama, IL-3 e IL-7 podem promover uma ou mais funções efetoras.

Alternativamente, as citocinas ou outros agentes que inibem a função efetora da célula são coadministradas com o anticorpo da presente invenção. Um tal modo de tratamento pode limitar a função efetora não desejada.

Adicionalmente, o anticorpo pode ser administrado com um ou mais antibióticos, incluindo mas não limitado a: antibióticos aminoglicósido (por exemplo apramicina, arbecacina, bambermicinas, butirosina, dibecacina, gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectrinomicina), aminociclitóis (por exemplo esprectinomicina), antibióticos anfenicol (por exemplo azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol, e tianfenicol), antibióticos ansamicina (por exemplo rifamida e rifampina), carbapenemas (por exemplo imipenema, meropenema, panipenema); cefalosporina (por exemplo cefaclor, cefadroxil, cefamandole, cefatrizina, cefazedona, cefozoprano, cefpimizole, cefpiramida, cefpiroma, cefprozil, cefuroxina, cefixima, cefalexina, cefradina), cefamicinas (cefbuperazona, cefoxitina, cefminox, cefmetazole, e cefotetano); lincosamidas (por exemplo clindamicina, lincomicina); macrolida (por exemplo azitromicina, brefeldina A, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, tobramicina), monobactâmicos (por exemplo aztreoname, carumoname, e tigemoname); mupirocina; oxacefemas (por exemplo flomoxef, latamoxef, e moxalactame); penicilinas (por exemplo amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bexzilpenicilínico, benzilpenicilina de sódio, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamecilina, penetamato iodídrato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, benzoato de penicilina V, penicilina V hidrabamina, penimepicicicina, e fencihicilina de potássio); polipéptidos (por exemplo bacitracina, colistina, polimixina B, teicoplanina, vancomicina); quinolonas (amifloxacina, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, enrofloxacina, feroxacina, flumequina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, pefloxacina, ácido pipemídico, rosoxacina,

rufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, trovafloxacina); rifampina; estreptograminas (por exemplo quinupristina, dalfopristina); sulfonamidas (sulfanilamida, sulfametoxazole); tetraciclenos (clortetraciclina, hidrocloreto de demeclociclina, demetylclortetraciclina, doxiciclina, duramicina, minociclina, neomicina, oxitetraciclina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina).

Agentes antifúngicos tais como anfotericina B, ciclopirox, clotrimazole, econazole, fluconazole, flucitosina, itraconazole, cetoconazole, niconazole, nistatina, terbinafina, terconazole, e tioconazole podem também ser usados.

Agentes antivirais incluindo inibidores da protease, inibidores da transcriptase reversa, e outros, incluindo interferões tipo I, inibidores de fusão viral, e inibidores de neuramidase, podem também ser usados. Exemplos de agentes antivirais incluem, mas não são limitados a, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, clevadina, enfuvirtida, entecavir, foscarnet, gangciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconarilo, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina, e zidovudina, podem ser usados.

Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados com outros regimes terapêuticos. Por exemplo, o doente a ser tratado com um anticorpo da presente invenção pode também receber terapia de radiação. A terapia de radiação pode ser administrada de acordo com protocolos comumente empregues na técnica e conhecidos dos especialistas na técnica. Tal terapia inclui mas não é limitada a radiação de césio, iridio, iodo, ou cobalto. A terapia de radiação pode ser irradiação no corpo inteiro, ou pode ser dirigida

localmente para um sítio específico ou tecido em ou sobre o corpo, tais como pulmão, bexiga, ou próstata. Tipicamente, a terapia de radiação é administrado em pulsos ao longo de um período de tempo desde cerca de 1 até 2 semanas. A terapia de radiação pode, no entanto, ser administrada durante períodos de tempo mais longos. Por exemplo, a terapia de radiação pode ser administrada a doentes com cancro da cabeça e pescoço durante cerca de 6 até cerca de 7 semanas. Opcionalmente, a terapia de radiação pode ser administrada como uma dose única ou como doses múltiplas, sequenciais. O médico especialista pode determinar empiricamente a dose ou doses apropriadas de terapia de radiação útil aqui. O anticorpo da presente invenção e uma ou mais outras terapias anti-cancro, podem ser empregues para tratar células cancerígenas *ex vivo*. É contemplado que esse tratamento *ex vivo* pode ser útil no transplante na medula óssea e particularmente, transplantes autólogos de medula óssea. Por exemplo, o tratamento de células e tecido(s) contendo células cancerígenas com anticorpo e uma ou mais outras terapias anti-cancro, tais como descrito acima, pode ser empregue para destruírem ou destruírem praticamente as células cancerígenas antes do transplante num doente recetor.

Está evidentemente contemplado que os anticorpos da invenção podem empregar em combinação ainda com outras técnicas terapêuticas tais como cirurgia ou fototerapia.

EXEMPLOS

Exemplos são fornecidos abaixo para ilustrar a presente invenção. Estes exemplos não se destinam a limitar a

presente invenção a qualquer aplicação ou teoria particular de operação.

Como referência às regiões variáveis de imunoglobulina, as posições são numeradas de acordo com o esquema de numeração de Kabat. Como referência às regiões constantes de imunoglobulina, as posições são numeradas de acordo com índice EU como em Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda).

Exemplo 1. Anticorpos anti-CD19 com modificações de aminoácido que aumentam a função efetora

Os anticorpos anti-CD19 da invenção destinam-se a candidatos clínicos para terapêutica anti-cancro. Para investigar a possibilidade de melhorar a função efetora de um antícorpo que visa CD19, versões variantes de anticorpos anti-CD19 foram manipuladas.

A Figura 6 fornece algumas sequências da região variável da cadeia pesada e leve dos anticorpos anti-CD19 4G7 (Meeker, T.C. et al. 1984. Hybridoma. 3: 305-320) e HD37 (Pezzuto, A. et al. 1987. J. Immunol. 138: 2793-2799) usados no presente estudo. As cadeias pesada e leve do parente quimérico de ratinho são marcadas com H0 4G7, H0 HD37, L0 4G7, e L0 HD37 respetivamente. As variantes da presente invenção podem ser feitas no contexto do antícorpo B43 anti-CD19 (Uckun, F.M. et al. 1998. Blood. 71:13-29) as quais têm propriedades similares a HD37 e partilham idênticas CDRs e uma identidade de sequência total de 97% em relação às sequências HD37 H0 e L0 mostrada na Figura 6. Os genes para WT 4G7 e HD37 VH e VL de murino, designados H0 e L0 respetivamente, foram construídos usando técnicas

de síntese genéticas e subclonagem no vetor de expressão de mamífero pcDNA3.1Zeo (Invitrogen) compreendendo as regiões constantes de IgG1 de cadeia pesada e leve kapa (C κ) de comprimento total. A variante S239D/I332E (função efetora anti-CD19 aumentada) foi construída na região Fc de um anticorpo híbrido IgG1/IgG2 (referido como "Híbrido", Figura 2) no vetor pcDNA3.1Zeo usando técnicas de mutagénese QuikChange (Stratagene). Todas as sequências foram sequenciadas para confirmar a fidelidade da sequência. Os plasmideos contendo gene de cadeia pesada (VH-CH1-CH2-CH3) (tipo selvagem ou variantes) foram co-transfetados com plasmídeo contendo gene de cadeia leve (VL-CL κ) para as células 293T. Os meios foram colhidas 5 dias após transfeção, e os anticorpos foram purificados a partir do sobrenadante usando cromatografia de afinidade de proteína A (Pierce, Catalog # 20334)

As afinidades de ligação relativas do Híbrido 4G7 S239D/I332E e do anticorpo 4G7 IgG1 foram calculadas através da determinação dos parâmetros de ligação num Biacore™ usando um painel de receptores Fc (Figura 7). Resumidamente, a proteína A/G foi acoplada a um fluxo de células dum chip CM5. A IgG foi primeiro diluída até 25 nM e imobilizada a proteína A / G de canal ~ 1000 RUs. O Fc γ R-His foi seriadamente diluído e injetado a 30 mL/min durante 2 min seguido por dissociação durante 3 min. Para determinar KD os sensogramas resultantes são "ajustados ao grupo" usando o modelo de interação 1:1 disponível no software de avaliação BIA. Os valores de KD que eram mais altos que 5×10^{-6} M são marcados como ND (não determinados) na Figura 7. Os dados indicam que o anticorpo WT IgG1 se liga a V158 Fc γ RIIIa com uma afinidade de aproximadamente 240 nM, consistentes com a literatura (Okazaki et al, 2004, J Mol Biol 336:1239-49; Lazar et al, Proc Natl Acad Sci USA 103(11):4005-4010). A versão

variante Fc liga-se a V158 Fc γ RIIIa com uma afinidade de cerca de 4,7 nM, indicando um aumento de afinidade de cerca de 50 vezes em relação a WT. A ligação da variante anti-CD19 a F158 Fc γ RIIIa é cerca de 16,7 nM.

Para medir a capacidade das variantes de anticorpo para mediarem a função efetora contra as células expressando CD19, a função efetora aumentada do anti-CD19 foi testada num ensaio CMCA de base celular.

Monócitos do sangue periférico humano (CMSPs) foram isolados dos leukopaks e usados como células efetoras, e foram usadas células cancerígenas CD19 positivas como células alvo. As células alvo foram semeadas em placas de 96 poços com 10,000 (Raji e MEC-1) e 20,000 (SUP-B15) células/poço e tratadas com os anticorpos específicos em triplicado. Os CMSPs isolados usando um gradiente Ficoll foram adicionados em excesso às células alvo e cocultivadas durante 4 h antes de processamento quanto à atividade LDH usando o Kit de Deteção de Citotoxicidade de acordo com as instruções do fabricante. A Figura 8a mostra os resultados do ensaio CMCA de comparação dos anticorpos 4G7 IgG1 e 4G7 Híbrido S239D/I332E, e HD37 IgG1 e HD37 Híbrido S239D/I332E na linha de células Daudi (LB). A Figura 8b mostra os resultados do ensaio CMCA de comparação de anticorpos 4G7 IgG1 e 4G7 Híbrido S239D/I332E, e anti-CD20 rituximab nas linhas de células SUP-B15 (LLA) e Raji (Linfoma de Burkitt). Os gráficos mostram que os anticorpos diferem não somente no seu EC50, refletindo a sua potência relativa, mas também o nível máximo de CMCA esperado pelos anticorpos a concentrações de saturação, refletindo a sua eficácia relativa. Melhorias consideráveis na potência e eficácia são observadas para as variantes de anticorpo Fc em comparação com o anticorpo com a região Fc WT. O anticorpo IgG1 químérico tem muito pouca eficácia ou potência. A EC50 da curva de dose response tal como o da Figura 8 representa

a concentração de um composto em que é observado 50% do seu efeito máximo. Num contexto clínico, a potência reflete a concentração do anticorpo necessária para realizar o seu efeito terapêutico. Assim os dados da Figura 8 mostram que os anticorpos anti-CD19 otimizados em Fc atuam in vivo a uma concentração ou dose menor que aquela de um anti-CD19 WT ou anticorpo anti-CD20. Na Figura 8b, enquanto WT IgG1 anti-CD19 à concentração de saturação medeia aproximadamente 10% de CMCA máximo, a Variante Fc anti-CD19 lisa aproximadamente 60% das células alvo. Num contexto clínico, a eficácia reflete o benefício terapêutico máximo do fármaco administrado.

Exemplo 2. Ligação de um anticorpo anti-CD19 da função efetora aumentada para uma linha de células tumorais derivadas das células B

Mediu-se a ligação relativa do Híbrido 4G7 S239D/I332E à linha de células Raji. Foram determinadas as afinidades da função efetora melhorada das variantes anti-CD19 usando o sistema DELFIA® (PerkinElmer Life Sciences) o qual é baseado em Fluorometria Resolvida no Tempo (FRT). O anti-CD19 (H0L0) é marcado com Európio usando o kit Eu-Labeling disponível na PerkinElmer Biosciences. O tipo selvagem não marcado (WT) ou variantes (frio) são diluídos seriadamente (tipicamente partindo de 1 μM) em passos de log 0 e misturado com uma concentração fixada de anti-CD19 marcado (ou quente). A mistura de anticorpos "quente" e "frio" é depois adicionada a 100,000 Células Raji (que têm uma alta densidade de superfície expressaram o抗ígeno CD-19) e incubada em gelo durante 30 min. O ensaio é aplicado essencialmente como um ensaio de competição para triagem dos anticorpos anti-CD19 de afinidades diferentes. Na ausência de variantes de competição de afinidade, o Eu-

anti-CD19 e CD19 de superfície interagem e produzem um sinal a 613 nm quando o Európio é excitado a 340 nm. A adição do tipo selvagem ou variante compete com a interação Eu-anti-CD19-CD19, reduzindo quantitativamente a fluorescência para viabilizar a determinação das afinidades de ligação relativa. A Figura 9 mostra resultados de um ensaio de ligação de superfície celular de anti-CD19 de função efetora melhorada a células Raji. Como pode ser observado, o valor EC₅₀ calculado é 1,2 nM.

Exemplo 3. CMCA de um anticorpo anti-CD19 com citotoxicidade aumentada contra linhas de células de linfoma múltiplo.

Com vista a avaliar as propriedades citotóxicas do anti-CD19 de função efetora aumentada, foram realizados ensaios CMCA sobre um painel de 14 linhas de células representando vários linfomas e leucemias (Figura 10a). As linhas de células testadas eram linhas de células DoHH-2 e SC1 de Linfoma Folicular (LF); linha de células Jeko-1 de Linfoma das Células do Manto (LCM); linhas de células Daudi e Raji de Linfoma de Burkitt (LB); linhas de células MEC1 e WaC3CD5 da Leucemia Linfocítica Crónica (LLC); linha de células Bonna-12 da Leucemia das Células Pilosas (LCP); linha de células BV-173 da Leucemia Mielogénica Crónica (LMC); e linhas de células VAL, SUP-B15, NALM-6, RS4;11, e 697 de Leucemia Linfooblástica Aguda (LLA). Os monócitos do sangue periférico humano (CMSPs) foram isolados a partir de leukopaks e usados como células efetoras, e as células cancerígenas CD19 positivas foram usadas como células alvo. As células alvo foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com os anticorpos específicos em triplicado. As CMSPs isoladas usando um gradiente de Ficoll foram adicionadas em excesso às células alvo e cocultivadas durante 4 h antes de processadas quanto à atividade LDH

usando o Kit de Deteção de Citotoxicidade de acordo com as instruções do fabricante. Ambos os parâmetros, potência (EC50) e eficácia (% CMCA) foram normalizados com os do rituximab (anti-CD20). Esta triagem demonstrou a superioridade citotóxica *in vitro* do anti-CD19 de função efetora aumentada sobre uma vasta gama de linhas de células, especialmente as representando a doença linfoproliferativa que se origina nos estados precoces do desenvolvimento das células B. A Figura 10b lista as linhas de células usadas e seus tipos de cancro correspondentes.

Exemplo 4. Anticorpos anti-CD19 com reduzido potencial de imunogenicidade.

Devido a um vasto uso de tecnologia de hibridoma, um número substancial de anticorpos são derivados de fontes não humanas. No entanto, as proteínas não humanas são frequentemente imunogénicas quando administradas a humanos, reduzindo grandemente setes modo a utilidade terapêutica. A imunogenicidade é o resultado de uma série complexa de respostas a uma substância que é percebido como estranho e pode incluir a produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, formação de complexos imunes, ativação de complemento, ativação de mastócitos, inflamação, respostas de hipersensibilidade, e anafilaxia. Vários fatores poem contribuir para a imunogenicidade de proteína, incluindo mas não limitado a sequência de proteína, via e frequência de administração, e população doentes. A imunogenicidade pode limitar a eficácia e a segurança de uma proteína terapêutica por múltiplas vias. A eficácia pode ser reduzida diretamente através da formação de anticorpos neutralizadores. A eficácia pode também ser reduzida indiretamente, por ligação a anticorpos quer neutralizantes quer não neutralizantes tipicamente conduz a rápida eliminação a partir de soro. Podem ocorrer graves

efeitos secundários e mesmo morte quando surge uma reação imunológica. Preferencialmente, a manipulação da proteína é usada para reduzir a imunogenicidade das proteínas alvo CD19 da presente invenção.

Com vista a reduzir o potencial de imunogenicidade das proteínas anti-CD19 da presente invenção, a imunogenicidade dos anticorpos 4G7 e HD37 anti-CD19 foi reduzida usando um método descrito na US 2006/0008883, intitulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof". Os métodos reduzem o potencial de imunogenicidade através do aumento do conteúdo humano de sequência do anticorpo por meio de mutações. As cadeias pesada e leve com reduzido potencial para a imunogenicidade são chamadas H1, H2, H3, H4, etc e L1, L2, L3, etc. e são mostradas nas Figuras 11 até 14. As cadeias pesada e leve dos anticorpos originais, 4G7 e HD37, são referidas como H0 e L0, respectivamente. Combinações das diferentes cadeias pesadas e leves foram expressas e os anticorpos resultantes, com nomes tais como H3L3, H3/L3 ou H3_L3, foram purificadas e examinadas. Os anticorpos anti-CD19 foram expressos pela transfeção transiente dos vetores de acordo com as cadeias pesada e leve no crescimento das células 293T em 10% de IgG ultra-baixa de soro fetal de bovino com 1mM de piruvato de sódio e 1X aminoácidos não essenciais (Gibco®, Invitrogen Hayward CA). Cinco dias após a transfeção, o meio de cultura foi removido e passado através de uma coluna de proteína A (Pierce Biotechnology Inc, Rockford MD). As cadeias pesadas podem ser feitas com qualquer tipo de domínio constante incluindo, em humanos, IgG1, IgG2 e híbridos compreendendo IgG1 e IgG2 assim como domínios constantes de ratinho tais como IgG1 e IgG2a, que podem ser referidos como mIgG1 e mIgG2a. As sequências de cadeias pesadas humanas podem ser encontradas na Figura 2. Foi medida a ligação relativa de variantes anti-CD19 com

reduzida imunogenicidade para uma linha de células Raji. As afinidades de imunogenicidade reduzida das variantes anti-CD19 foram determinadas usando o sistema DELFIA® (PerkinElmer Life Sciences) que é baseado em Fluorometria Resolvida no Tempo (FRT). O Anti-CD19 é marcado com Európio usando o kit Eu-Labeling disponível da PerkinElmer Biosciences. Tipo selvagem (WT) não marcado ou variantes (frio) são diluídos seriadamente (partindo tipicamente de 1 μ M) em passos $\frac{1}{2}$ log e misturados com uma concentração fixada de anti-CD19 marcado (ou quente). A mistura de anticorpos "quentes" e "frios" são depois adicionados a 100,000 células Raji (que têm uma alta densidade de抗ígenio CD-19 expresso de superfície) e incubadas em gelo durante 30 min. O ensaio é essencialmente aplicado como um ensaio de competição para triar anticorpos anti-CD19 de afinidades diferentes. Na ausência de variantes de competição de afinidade, Eu-anti-CD19 e CD19 de superfície interagem e produzem um sinal a 613 nm quando o Európio é excitado a 340 nm. A adição do tipo selvagem ou variante compete com interação Eu-anti-CD19 - CD19, reduzindo quantitativamente a fluorescência para viabilizar a determinação de afinidades de ligação relativa. A Figura 15a mostra os resultados de um ensaio de ligação de superfície celular de variantes 4G7 de imunogenicidade reduzida a células Raji. Com base na afinidade e estabilidade de ligação, a região variável 4G7 H1L1 foi escolhida para desenvolvimento adicional. A Figura 15b mostra os resultados de um ensaio CMCA em modelos de imunogenicidade reduzida HD37_H2L1 Híbrido S239D/I332E e 4G7_H1L3 Híbrido S239D/I332E na linha de células MEC-1 (LLC). Este ensaio CMCA foi realizado como nos ensaios anteriores. Ambos os anticorpos são ativos nesta linha de células e portanto e, portanto, podem ser tratamentos potenciais para CLL.

Exemplo 5. Aumento da afinidade e estabilidade da função efetora de anti-CD19 aumentada.

A maturação de afinidade 4G7 mAb H1L1 foi realizada com vista a aumentar adicionalmente a afinidade de ligação CD19 assim como a potência CMCA. A maturação de afinidade foi realizada em três estádios usando uma abordagem de manipulação computacional/proteína. Primeiro, operando sob a hipótese de que os resíduos da determinação de especificidade (SDRs) (Padlan, E.A. et al. 1995. FASEB J. 9: 133-139) nas CDRs de um anticorpo já foram otimizados pelas células B no processo de hipermutação somática *in vivo*, uma biblioteca de variantes 94 foi designado para determinar aqueles resíduos nas CDRs que foram críticos para a ligação a抗ígenio, e assim não deve ser mudado durante o processo de manipulação. Esta biblioteca consiste de uma ou duas mutações de "sondagem" mutações feitas nas posições nas CDRs com sítios escolhidos usando modelação estrutural assim como a probabilidade de que a posição é frequentemente um SDR, que foi compilado a partir da análise de estruturas complexa抗ígeno-anticorpo disponíveis no Protein Data Bank (PDB) (MacCallum, R.M. et al. 1996. JMB 262: 732-745; Almagro, J.C. 2004 J. Mol. Recognit. 17:132-143).

Foram introduzidas mutações variantes usando o kit de mutagénese QuikChange no formato Fab do modelo H1L1 e continha uma etiqueta 6X-His. As variantes Fabs foram expressas em células 293T usando placas d 24 poços e foram analisadas por AlphaScreen ou citometria de fluxo usando células Raji ou RS4;11, e com a concentração de cada variante determinada usando um chip de ligação His por Biacore™. Das 50 posições, foram identificadas 17 posições que foram críticas para ligação a抗ígenio, permitindo-nos reduzir o tamanho da biblioteca na ronda seguinte de

maturação de afinidade e dando valiosa informação estrutural sobre quais as posições que ficam junto da interface do抗igenio e que fariam bons alvos para encontrar variantes de afinidade aumentadas. Os 17 SDRs identificados nas nossas análises estão em excelente concordância com o número médio de SDRs presentes nos anticorpos cujos complexos抗igenio-anticorpo foram resolvidos (Almagro, J.C. 2004 *J. Mol. Recognit.* 17:132-143). Para além da informação estrutural valiosa ganha com esta biblioteca, foram obtidas algumas variantes que tinham uma afinidade aumentada.

As restantes 33 posições CDR foram classificadas por ordem de importância com base na análise dos resultados da primeira biblioteca e através do mapeamento do SDRs do modelo estrutural do modelo H1L1. Através desta análise determinou-se que praticamente toda a interface de ligação de抗igenio-anticorpo pode ser explorada com uma frequência total de 12,2 aminoácidos por posição (~9.3 novas variantes por posição) com uma segunda ronda de tamanho de biblioteca de 279 variantes. A Library Design Automation (LDA™) (US 2006/0234303) foi usada para criar uma biblioteca de variantes otimizada que foi ajustada para adequação e cobertura com base no número de variantes desejadas. A biblioteca final da segunda ronda quando ajustada para formato de alto rendimento contendo 265 variantes a 30 posições. Esta biblioteca produziu diversas variantes mostrando afinidades de ligação aumentadas. As variantes anti-CD19 Fab foram triadas por citometria de fluxo para determinar a afinidade. A linha de células RS4;11, conhecida por expressar CD19, foi suspensa em PBS e plaqueada a 200.000 células/poço numa placa de 96 poços de fundo redondo. Uma diluição seriada de anticorpos CD19 foi adicionada a células RS4;11 a uma concentração desconhecida. As células foram incubadas sobre gelo durante

30 minutos e depois lavadas 4 vezes em PBS. Um anti-Fab PE-marcado F(ab')2 foi diluído a 1/50 em PBS, o qual foi depois usado para resuspender as RS4;11 revestidas com anti-CD19 Fab. As células foram incubadas durante 30 minutos e lavadas duas vezes. As células foram depois fixadas e os ensaios de ligação foram avaliados num citómetro de fluxo FACS Canto II. O MFI foi usado para medir a força de ligação. A partir das duas bibliotecas um e dois, foi obtido um total de 30 variantes de afinidade únicas em 11 posições.

A análise dos dados de ligação das duas primeiras bibliotecas assim como a análise estrutural adicional permitiu-nos desenhar uma terceira e final biblioteca contendo combinações de 2-8 variantes únicas. Esta biblioteca consistiu de 149 variantes em 8 posições. Destas, 20 variantes mostraram um aumento significativo na afinidade e foram selecionadas para conversão para o formato de comprimento completo para medição simultânea da afinidade de ligação e CMCA. Para avaliar as propriedades da solução, foram realizados ensaios de estabilidade nestas variantes. O conjunto final das mutações incluídas nas 20 finais eram as variantes de cadeia pesada T57P, K58E, S100cT, R100dS, e as variantes de cadeia leve L27cQ, S27eV, A55N, F96I, e F96N. Estudos de estabilidade acelerada revelaram que pelo menos uma das mutações de afinidade aumentada criou instabilidade na proteína e fez com que estas variantes perdessem toda a potência após somente 8 h a 37°C. Tendo em conta os dados de ligação e estabilidade, uma afinidade definitiva do candidato mAb amadurecido pode ser selecionada a qual apresentou um aumento de ~10 vezes de afinidade de ligação nas células RS4;11 relativamente ao H1L1 mAb (Figura 16). As variantes delineadas para aumentarem a estabilidade a longo termo da molécula anti-CD19 foram também desenhadas e triadas. A Figura 17 mostra

os dados de ligação para as variantes incubadas durante 5 dias a 37°C, pH 9,0 em 200 mM Tris-LCP, demonstrando a melhoria na estabilidade obtida a partir de uma variante anti-CD19.

Todas as substituições unitárias feitas para maior estabilidade e/ou afinidade são mostrados na Figura 27. A Figura 28 lista todas as variantes da região variável anti-CD19 construída para otimizar a afinidade e estabilidade. A Figura 29 lista as variantes preferidas e o aumento relativo na afinidade de ligação versus o H1L1 mAb parente. As sequências para as variantes de cadeia pesada de afinidade e/ou estabilidade aumentada preferidas são mostradas na Figura 18. As sequências para as variantes de cadeia leve de afinidade e/ou estabilidade aumentada preferidas são mostradas na Figura 19. Sequências de aminoácidos de variante S239D/I332E Híbrido de comprimento completo contendo as regiões variáveis de afinidade e estabilidade melhorada são fornecidas como SEQ ID NOS: 86-110. As CDR's de afinidade e estabilidade melhorada são fornecidos como SEQ ID NOS: 111-131.

Exemplo 6. Propriedades antiproliferativas de 4G7 Híbrido S239D/I332 em células Raji.

Para observar um efeito antiproliferativo *in vitro*, muitos anticorpos requerem ligação cruzada, usualmente conseguida com um anticorpo secundário. Foi proposto que os efeitos correspondentes *in vivo* destes anticorpos possam estar dependentes da ligação cruzada mediada por receptores Fc expressados na superfície das células efetoras. Nesta experiência as células Raji foram crescidas durante 3 dias na presença de 100 ng/mL 4G7 Híbrido S239D/I332E, 4G7 IgG1, ou anti-CD20 (rituximab) ou anticorpos controlo (não-CD19 ligados à região variável com variantes Fc Híbrido

S239D/I332E) a várias concentrações com 10x o excesso molar de anticorpo de ligação cruzada. O crescimento celular foi medido usando um ensaio de luminescência dependente de ATP. Os resultados para o ensaio de antiproliferação são mostrados na Figura 20. Os dois 4G7 Híbrido S239D/I332E e 4G7 IgG1 mostram mais fortes efeitos antiproliferação que o rituximab.

Exemplo 7. Propriedades antiproliferativas de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 em células SU-DHL-6.

Nesta experiência as células SU-DHL-6 foram ou crescidas durante 3 dias na presença de 4G7 humanizada e Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas e anticorpos controlo a várias concentrações com 10x o excesso molar de anticorpo de ligação cruzada e 6000 células/poço ou foram crescidas na presença de uma concentração do anticorpo fixada a 3000 células/poço e a viabilidade a pontos específicos de tempo medida durante um total de 72 horas. Os resultados do ensaio de antiproliferação são mostrados na Figura 21. A estabilidade e afinidade melhorada para 4G7 do Híbrido S239D/I332E mostra mais forte efeito antiproliferativo que o rituximab. A estabilidade e afinidade melhoradas de 4G7 Híbrido S239D/I332E mostram também efeitos antiproliferativos mesmo na ausência de anticorpo de ligação cruzada.

Exemplo 8. Fagocitose de Raji e células RS4:11 com estabilidade e afinidade melhoradas do Híbrido S239D/I332E para 4G7.

Ao contrário das células NK as quais expressam somente Fc γ RIIIa e algumas vezes Fc γ RIIc, os monócitos e as células efetoras derivadas de monócito expressam uma gama de Fc γ Rs,

incluindo Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, e Fc γ RIIIa. Assim a ativação e função das células efetoras derivadas de monócitos, incluindo por exemplo macrófagos, podem ser dependentes ou envolver complexos imunológicos de anticorpo com outros receptores que não somente Fc γ RIIIa. Evidentemente que como descrito na WO 2007/04/635, Desjarlais J.R. et al., a fagocitose por macrófagos é mediada em parte por envolvimento do anticorpo com Fc γ RIIa.

Para avaliar a capacidade de estabilidade e afinidade melhoradas do Híbrido S239D/I332E para 4G7 para mediar a fagocitose a foi realizado um ensaio de fagocitose baseada em citometria de fluxo. Monócitos CD14 $^{+}$ purificados foram cultivados em fator de estimulação de colónia de macrófagos (50ng/mL) durante 5 dias numa incubadora humidificada para a diferenciação de macrófagos. As células RS4;11 ou Raji foram usadas como alvo. As células alvo foram marcadas com PKH67 (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram adicionadas a uma placa de 96 poços após às quais foi adicionada uma diluição seriada de anticorpos anti-CD19 modificados em WT e Fc. Macrófagos derivados de monócitos foram depois adicionados aos poços a um efetor para visar uma proporção de 4:1. Estes ensaios foram realizados na presença de soro humano. A cocultura de células foi resumidamente centrifugada e depois incubada numa incubadora humidificada durante 4 horas. As células foram colhidas, e os macrófagos foram corados com uma segunda cor fluorescente para os distinguir dos do alvo. As células foram fixadas em PFA 1% e a fagocitose foi avaliada num Citómetro de fluxo FACS Canto II. A leitura da fagocitose foi determinada pelo número de células positivas duplas divididas pelo número total de células tumorais. Os resultados dos ensaios de fagocitose são mostrados na Figura 22. A estabilidade e afinidade melhoradas de Híbrido S239D/I332E para 4G7, mostra um nível aumentado de

fagocitose em ambas as linhas de células em comparação com o anticorpo IgG1 anti-CD19.

Os macrófagos são fagócitos que atuam como captadores para consumir as células mortas, as substâncias estranhas, e outros detritos. Importante, os macrófagos são células profissionais apresentadoras de抗igénio (CAAs), removendo os patogénios e estruturas estranhas dos tecidos periféricos, depois migrando para os órgãos linfoideos secundários para iniciar respostas imunológicas adaptativas por ativação das células T naives. Portanto os resultados da experiência anterior sugerem que a modificação dos anticorpos anti-CD19 pode permitir os mecanismos de ação que incluem ambas as funções efetoras citotóxicas inatas, assim como as funções efetoras que podem conduzir potencialmente à resposta imunológica adaptativa a longo prazo.

Exemplo 9. CMCA de estabilidade e afinidade melhoradas de x Híbrido S239D/I332E para 4G7 contra linhas de células de linfoma múltiplo usando células assassinas naturais (NK) purificadas

Com vista a avaliar as propriedades citotóxicas de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7, foram realizados ensaios CMCA com células NK purificadas num painel de 6 linhas de células representando vários linfomas e leucemias (Figura 23). CMCA com células NK purificadas é feita em placas microtituladoras de 96 poços. As células NK foram purificadas a partir de CMSPI humano usando o kit da Miltenyi Biotec (Cat #130-091-152) e incubadas em 10% de FBS/RPMI1640 ao longo da noite com 10 ng/mL de IL-2. No dia seguinte, 10,000 (WaC3CD5, Namalwa, Bonna-12, Ramos) ou 20,000 (RS4;11, BV-173) células de cancro alvo são opsonizadas com concentrações variáveis de

anticorpo e 50k de células NK são usadas para cada concentração de anticorpos em triplicado. As células alvo são lavadas três vezes enquanto as células NK são lavadas duas vezes com RPMI1640 e ambas resuspendidas em 1% de PBS/RPMI1640 e adicionadas às soluções de anticorpo. Após 4 horas de incubação a 37°C numa incubadora humidificada com 5% de CO₂, o ensaio foi quantificado usando sistema de deteção dependente de fluorescência CytoTox-One dependente de LDH da Promega (#PAG7891). O sinal de LDH total é determinado a partir de células alvo lisadas Triton-X100 (LDH Alvo Total) e usado para normalizar valores experimentais ajustados contra a base de LDH espontânea (Base espontânea). Assim a % CMCA = ((Valor Experimental - Base Espontânea) / (LDH Alvo Total - LDH Alvo)) * 100. A base espontânea é o valor obtido a partir de células Alvo e NK coincubadas na ausência de anticorpo. LDH alvo é o valor das células alvo cancerígenas sozinhas libertando espontaneamente LDH durante a incubação. A Figura 23 mostra os resultados de CMCA, ensaio para 6 linhas de células usando Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7, 4G7 IgG1 (com região variável afinidade/estabilidade otimizada), rituximab (anti-CD20), e um anticorpo isotipo controlo. Para todas as linhas de células testadas, Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 tem melhor desempenho na potência e eficácia em comparação com 4G7 IgG1 e rituximab.

Exemplo 10. Híbrido S239D/I332E estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 ligando células 293T transfetadas CD19

Um clone CD19 humano foi encomendado à Origene (No. de catálogo SC127938) e transfetada para células 293T. As células foram suspensas em PBS e plaqueadas a 100 000 células/poço. Uma diluição seriada de 4G7 Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas foi

adicionada às células e depois as células foram incubadas em gelo durante 30 minutos e depois lavadas 4 vezes em PBS. Um anti-Fab PE-marcado F(ab')2 foi diluído 1/50 em PBS, o qual foi depois usado para resuspender as células 293T revestidas com anti-CD19 de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7. As células foram incubadas durante 30 minutos e lavados duas vezes. As células foram então fixadas e a ligação foi avaliada num citómetro de fluxo FACS Canto II. A Figura 24 mostra os resultados para este teste. Os resultados mostram que Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 ligam as células 293T transfetadas com CD19 e não ligam as células controlo (células 293T normais).

Exemplo 11. 4G7 Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas é de reacção cruzada com CD19 de cinomolgos e macacos rhésus.

A testagem pré-clínica de fármacos em macacos é tipicamente um importante passo na descoberta de medicamentos a fim de avaliar a toxicidade potencial. Foram obtidas amostras de sangue de cinco cinomolgos (*Macaca fascicularis*; género = *Macaca* (Latim) ou Macaco (Português); espécies = *fascicularis*) e cinco macacos rhésus (*Macaca mulatta*). Híbrido S239D/I332E de 4G7 anti-CD19 de estabilidade + afinidade melhorada, IgG1 anti-CD19 (imunogenicidade reduzida, mas sem região variável afinidade/estabilidade otimizada), rituximab (anti-CD20), e controlo negativo (Fc aumentado, região variável não ligada) foram diretamente marcadas com FITC. O Rituximab foi também marcado com CAA para identificar as células da fração de células B. Todas as CMSPs humanas foram usadas como controlos positivos. As amostras de sangue e CMSPs foram pré-incubadas com 2 mg/mL de um isotipo de anticorpo controlo com Fc aumentada para bloquear qualquer potencial ligação FcγR. Em cada

experiência, rituximab-CAA e uma das variantes de teste foram incluídas no ensaio. A deteção é feita usando um Citómetro de fluxo FACS Canto II com frações de linfócitos de porta baseados na dispersão para a frente e lateral. Os resultados são mostrados na Figura 25. Anti-CD19 maduras não afinidade/estabilidade (assim como o seu anticorpo parente de murino) não reage cruzadamente com CD19 de conimolgos ou rhésus. As variantes que aumentam a ligação e estabilidade da molécula anti-CD19 viabilizam a reatividade cruzada de Híbrido S239D/I332E de estabilidade e afinidade melhoradas para 4G7 tanto para CD19 de conimolgos como de rhésus.

Exemplo 12. CMCA de um anticorpo anti-CD19 de função efetora melhorada com reduzido conteúdo de fucose

Os anticorpos anti-CDf19 com função efetora melhorada (4G7 H1L1 Híbrido S239D/I332E) foram avaliados com reduzido conteúdo de fucose. A linha de células Lec13 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 49:533-545 (1986)) foi utilizada para expressar anticorpos anti-CD19 com reduzido conteúdo de fucose. Lec13 refere-se a linha de células mutante de Ovário de Hamster Chinês (OHC) resistentes a lectina as quais apresentam um metabolismo da fucose defeituoso e portanto têm uma capacidade diminuída para adicionar fucose ao complexo de hidratos de carbono. Aquela linha de células é descrita em Ripka & Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1):51-62; e Ripka et al., 1986, Arch. Biochem. Biophys. 249(2):533-545. Acredita-se que as células Lec13 não têm a transcrição para GDPD-manose-4,6-desidratase, uma enzima chave para o metabolismo da fucose. Ohyama et al., 1988, J. Biol. Chem. 273(23): 14582-14587. A GDP-D-manose-4,6-desidratase gera GDP-mannose-4-ceto-6-D-desoximanose a partir de GDPmanose, a qual é depois convertida pela proteína FX em GDP-L-fucose. A expressão de oligossacáridos

fucosilados está dependente de substratos dadores de GDP-L-fucose e fucosiltransferase(s). A linha de células Lec13 de OHC é deficiente na sua capacidade para adicionar fucose, mas fornece IgG com oligossacárido o qual é por sua vez similar aquele encontrado em linhas de células OHC normais e no soro humano (Jefferis, R. et al., 1990, Biochem. J. 268, 529-537; Raju, S. et al., 2000, Glycobiology 10, 477-486; Routier, F. H., et al., 1997, Glycoconj. J. 14, 201-207). As células OHC e HEK293 normais adicionam fucose ao oligossacárido IgG num elevado grau, tipicamente desde 80-98%, e as IgGs dos seros são também altamente fucosiladas (Jefferis, R. et al., 1990, Biochem J. 268, 529-537; Raju, S. et al., 2000, Glycobiology 10, 477-486; Routier, F. H., et al., 1997, Glycoconj. J. 14, 201-207; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277(90):26733-26740). Está bem estabelecido que os anticorpos expressos nas células Lec13 transfetadas produzem consistentemente cerca de 10% de hidrato de carbono fucosilado (Shields et al., 2002, J Biol Chem 277(90):26733-26740).

Os ensaios de CMCA foram realizados em células RS4;11 e MEC-1 usando anticorpos anti-CD19 com e sem variantes com função efetora melhorada e com e sem fucosilação reduzida. A Figura 26 mostra os resultados destes ensaios CMCA. A potência e a eficácia de CMCA são similares para o anticorpo anti-CD19 com modificações de aminoácido (4G7_H1L1_Hybrid_239D/I332E + fucose) e IgG1 anti-CD19 com reduzido conteúdo de fucose (4G7_H1L1_IgG1_WTfucose). A potência de CMCA é adicionalmente aumentada através da combinação da modificação de aminoácido com reduzido conteúdo de fucose (4G7_H1L1_Hybrid_239D/332E-fucose). (Figura 26). Esta experiência ilustra portanto que podem ser usadas combinações de modificações de aminoácidos e de glicoformas modificadas para otimizar anticorpos anti-CD19 para as propriedades de função efetora.

O uso da linha de células Lec13 não se destina a limitar a presente invenção do modo particular de redução do conteúdo de fucose. Uma diversidade de outros métodos são conhecidos na técnica para controlar o nível de oligossacáridos fucosilados e/ou de bisseção que são ligados covalentemente à região Fc, incluindo mas não limitado a expressão em vários organismos ou linhas de células, manipuladas ou de outra forma (por exemplo células Lec13 OHC ou células YB2/0 de hibridoma de rato), regulação de enzimas envolvidas no passo de glicosilação (por exemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferase] e/ou β 1-4-N-acetylglucosaminyltransferase III [GnTIII]), e modificação de hidrato de carbono(s) de modificação após a IgG ter sido expressa (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnology e Bioengineering 87(5):614-621); (US 6,602,684; US 2003/0157108; US 2003/0003097; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1).

O uso de modificações específicas para aumentar a função efetora, por exemplo as substituições 239D e 332E e o reduzido nível de fucose, não se destinam a limitar os anticorpos anti-CD19 a estas modificações específicas. Como descrito acima na secção intitulada "Modificações para otimizar a função efetora", um grande número de modificações, incluindo modificações de aminoácido e de glicoformas modificadas, são divulgadas para os anticorpos anti-CD19 para melhorar as suas propriedades da função efetora.

Exemplo 13. Anticorpos anti-CD19 inibem a proliferação de células B primárias - aplicações de anticorpos anti-CD19 no tratamento de doenças autoimunes

A capacidade dos anticorpos anti-CD19 aqui divulgados para empobrecerem as células B através de função efetora CMCA é exemplificada pela sua capacidade para lisar uma diversidade de linhas de células representativas de uma gama de linhagem de célula B, como mostrado nos exemplos precedentes. Esta função é mediada por células efetoras tais como células NK e macrófagos que expressam Fc γ Rs, desencadeamento que induz a lise das células alvo revestidas com CD19. Um mecanismo adicional de ação pode também ser mediado contra células B ativadas por抗ígenio. A ativação por抗ígenio das células B ser mimetizada pelo uso de anticorpos para receptores de células B (RCB). Isto conduz à sua proliferação na cultura, uma medida genérica de ativação.

A ligação de抗ígenios pode ser mimetizada *in vitro* por ligação cruzada da RCB (mu ou IgM) com o anticorpo anti-mu (anti- μ , anti-IgM). Com vista a demonstrar esta atividade, Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSPs) foram preparadas a partir do Pacote de Leucoforese por gradiente de densidade Ficoll, e as células B primárias humanas foram purificadas a partir das CMSPs usando o kit de seleção magnética negativa comprada na Miltenyi Biotec. O ensaio de proliferação foi realizado em FBS a 10%/meio RPMI1640 num volume total de 100 μ L em placas de microtitulação de 96 poços em triplicado. A ativação das células B foi induzida usando fragmento F(ab')2 de anticorpo anti-mu de cabra (Jackson ImmunoResearch, Inc.). Em 50 μ L de meio, diluições seriadas do anticorpo anti-mu foram retiradas aliquotas para placas microtituladoras de 96 poços, às quais foram

adicionadas 83,000 células B purificadas num volume de 50 µL. Depois as placas microtituladoras foram incubadas a 37°C durante 3 dias após os quais, foi usado o formato de ensaio de luminescência de ATP (Cell TiterGlo Kit da Promega) para detetar as células vivas usando o luminómetro. A Figura 30a mostra que há uma dependência de dose da proliferação das células B na concentração de anticorpo anti-mu.

Com vista a avaliar a capacidade de anticorpos anti-CD19 WT (4G7_H3_L1 IgG1_WT) e variante (4G7_H3_L1_Hybrid_239D/332E) para modular a proliferação das células B, foi realizado um ensaio para monitorizar a viabilidade das células B humanas primárias na presença de anti-CD19 e coestimular o anticorpo anti-mu. Como descrito acima, foram preparadas CMSPs a partir do Pacote de Leucoforese por gradiente de densidade Ficoll, e as células B humanas primárias foram purificadas a partir das CMSPs usando seleção magnética negativa. O ensaio de proliferação foi realizado em FBS a 10%/meio RPMI1640 num volume total de 100 µL em placas microtituladoras de 96 poços em triplicados. Para induzir a ativação das células B, foi usado o fragmento F(ab')2 do anticorpo anti-mu de cabra. Em 50 µL de meio, uma concentração fixa (2 mg/mL) de anti-mu com diluições seriadas cinco vezes dos anticorpos foram realizadas em placas microtituladoras de 96 poços, às quais 100,000 células B purificadas foram adicionadas num volume de 50 µL. Depois as placas microtituladoras foram incubadas a 37°C durante 3 dias após os quais foi usado um formato de ensaio de luminescência de ATP para detetar as células vivas usando iluminômetro.

Os resultados, fornecidos na Figura 30b, mostram que anticorpo anti-CD19 WT não tem efeito na proliferação das

células B primárias, similarmente ao controlo negativo com anticorpo anti-CD30 (CD30 não é expresso nas células B). Pelo contrário, o anticorpo anti-CD19 compreendendo modificações Fc tem atividade inibidora significativa contra a viabilidade das células B. Especialmente, uma sinalização *in vitro* como resultado da ligação cruzada anti-mu anticorpo mimetiza o envolvimento de抗ígenio de RCB, e é um proxy para o envolvimento de RCB pelo autoantígeno numa situação clínica autoimune.

A patogénese da maioria das doenças autoimunes está acoplada à produção de autoanticorpos contra os próprios抗ígenios, conduzindo a uma diversidade de patologias associadas. Por exemplo, SLE é caracterizada pela produção de anticorpos auto ou próprios para duplicar a cadeia de ADN. Consequentemente, na experiência acima descrita o envolvimento de RCB *in vitro* por anticorpo anti-mu mimetiza a estimulação das células B em doentes de lúpus *in vivo* por anticorpos anti-cadeia dupla de ADN. Os autoanticorpos são produzidos por células de plasma terminalmente diferenciadas que são derivadas de células B naïves ou memória. Além disso, as células B podem ter outros efeitos na patologia autoimune, como células apresentando抗ígenio (CAAs) que podem interagir com e estimular células T auxiliares, estimulando mais o ciclo de resposta imune anti próprio. Dada a expressão de CD19 na maioria da linhagem de células B, variando desde pré-B para células plasmáticas, os anticorpos desta invenção pode ter grande utilidade para o tratamento de doenças autoimunes. Exemplos dessas doenças autoimunes incluem, mas não são limitados a, artrite reumatoide (RA), sistema de lúpus eritematóide (SLE ou lúpus), esclerose múltipla, Síndrome de Sjogren, e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

O exemplo corrente demonstra que os anticorpos anti-CD19 como aqui divulgados podem inibir substancialmente a proliferação das células B num modo dependente de dose, indicando que podem inibir a ativação das células B estimuladas por antigénio. A ativação das células B pelo antigénio pode também iniciar o processo de comutação de classe e, em última análise, a diferenciação terminal em células plasmáticas secretoras de anticorpos. Os anticorpos como aqui divulgados são portanto capazes de inibirem estes processos através de um mecanismo adicional de ação que não requer células efetoras. É esperado que esta inibição tenha impacto benéfico na doença autoimune impedindo a diferenciação terminal das populações de células B naïves e de memória, prevenindo assim a diferenciação das células plasmáticas secretoras de autoanticorpos. Também é possível que aspetos adicionais da biologia das células B tais como apresentação de antigénio seja afetada pelos anticorpos anti-CD19.

> IgG1 G1m(a,z) alotipo (SEQ ID NO:80)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLPPKPQDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REBQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

> IgG1 G1m(a,x,z) alotipo (SEQ ID NO:81)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLPPKPQDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSVVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
```

> IgG1 G1m(f) alotipo (SEQ ID NO:82)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG1 G1m(a,f) alotipo (SEQ ID NO:83)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG2 G2m(n+) alotipo (SEQ ID NO:84)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG2 G2m(n-) alotipo (SEQ ID NO:85)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

> 4G7 H1 Hibrido S239D/I332E (SEQ ID NO:86)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWG
QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.52 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:87)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWG
QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.78 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:88)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
NAGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWG
QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.191 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:89)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGTEYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYyCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVSVLTvvHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.192 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:90)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGPKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYyCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVSVLTvvHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.196 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:91)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NDGPKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYyCARGTYYYGTSVFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVSVLTvvHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.201 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:92)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAACASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NSGTYNEKFQGRVTISSLKSIATMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREG
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.202 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:93)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAACASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NEGTYNEKFQGRVTISSLKSIATMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREG
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.203 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:94)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAACASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NSGTEYNEKFQGRVTISSLKSIATMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQ
 GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREGQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> 4G7 H1.204 Híbrido S239D/I332E (SEQ ID NO:95)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
 NEGTEYNEKFQGRVTISSDKSISTA YMELSSLRSED TAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMQLSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

> 4G7 L1 (SEQ ID NO: 96)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRM
 SNLASGVPDFRGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.26 (SEQ ID NO: 97)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLASGVPDFRGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.32 (SEQ ID NO: 98)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNVNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLASGVPDFRGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.64 (SEQ ID NO: 99)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRM
 SNLASGVPDFRGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.68 (SEQ ID NO:100)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM
 SNLASGVVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7_L1.96 (SEQ ID NO:101)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM
 SNLNNSGVVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 TYSLSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7_L1.145 (SEQ ID NO:102)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLASGVVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7_L1.148 (SEQ ID NO:103)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7_L1.149 (SEQ ID NO:104)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7_L1.154 (SEQ ID NO:105)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7_L1.155 (SEQ ID NO:106)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.160 (SEQ ID NO:107)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNANTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.162 (SEQ ID NO:108)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNANANTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.163 (SEQ ID NO:109)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNANSNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 L1.164 (SEQ ID NO:110)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNANGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
 MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 4G7 VH CDR2 D55A (SEQ ID NO:111)

YINPYNAGTKYNEKFKG

> 4G7 VH CDR2 T57P (SEQ ID NO:112)

YINPYNDGPKYNEKFKG

> 4G7 VH CDR2 K58E (SEQ ID NO:113)

YINPYNDGTEYNEKFKG

> **4G7 VH CDR2 D55S (SEQ ID NO:114)**
YINPYNSGTKYNEKFKG
> **4G7 VH CDR2 D55E (SEQ ID NO:115)**
YINPYNEGTKYNEKFKG
> **4G7 VH CDR3 S100T (SEQ ID NO:116)**
GTYYYGTRVFDY
> **4G7 VH CDR3 R100dS (SEQ ID NO:117)**
GTYYYGSSVFDY
> **4G7 VH CDR3 S100cT/R100dS (SEQ ID NO:118)**
GTYYYGTSVFDY
> **4G7 VL CDR1 L27cQ (SEQ ID NO:119)**
RSSKSLQNSNGNTYLY
> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eV (SEQ ID NO:120)**
RSSKSLQNVNGNTYLY
> **4G7 VL CDR1 S27eV (SEQ ID NO:121)**
RSSKSLLNVNGNTYLY
> **4G7 VL CDR1 G29A (SEQ ID NO: 122)**
RSSKSLLNSNANTYLY
> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eV/G29A (SEQ ID NO:123)**
RSSKSLQNVNANTYLY
> **4G7 VL CDR1 S27eA (SEQ ID NO:124)**
RSSKSLLNANGNTYLY
> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA/G29A (SEQ ID NO:125)**
RSSKSLQNANANTYLY
> **4G7 VL CDR1 G29S (SEQ ID NO:126)**
RSSKSLLNSNSNTYLY
> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA/G29S (SEQ ID NO:127)**
RSSKSLQNANSNTYLY
> **4G7 VL CDR1 L27cQ/S27eA (SEQ ID NO:128)**
RSSKSLQNANGNTYLY
> **4G7 VL CDR2 A55N (SEQ ID NO:129)**
RMSNLNS
> **4G7 VL CDR3 F96I (SEQ ID NO:130)**
MQHLEYPIT

> **4G7 VL CDR3 F96N (SEQ ID NO:131)**
MQHLEYPNT
> **4G7 VH CDR1 (SEQ ID NO:132)**: SYVMH
> **4G7 VH CDR2 (SEQ ID NO:133)**: YINPYNDGTKYNEKFKG
> **4G7 VH CDR3 (SEQ ID NO:134)**: GTYYYGSRVFDY
> **4G7 VL CDR1 (SEQ ID NO:135)**: RSSKSLLNSNGNTLY
> **4G7 VL CDR2 (SEQ ID NO:136)**: RMSNLAS
> **4G7 VL CDR3 (SEQ ID NO:137)**: MQHLEYPFT
> **HD37 VH CDR1 (SEQ ID NO:138)**: SYWMN
> **HD37 VH CDR2 (SEQ ID NO:139)**: QIWPGDGDTNYNGKFKG
> **HD37 VH CDR3 (SEQ ID NO:140)**: RETTTVGRYYAMDY
> **HD37 VL CDR1 (SEQ ID NO:141)**: KASQSVVDYDGDSYLN
> **HD37 VL CDR2 (SEQ ID NO:142)**: DASNLVS
> **HD37 VL CDR3 (SEQ ID NO:143)**: QQSTEDPWT

Lisboa, 07 de Abril de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga CD19 compreendendo:
uma cadeia pesada CDR1, uma cadeia pesada CDR2, e uma cadeia pesada CDR3 descrita na SEQ ID NO: 40; e uma cadeia leve CDR1, uma cadeia leve CDR2, e uma cadeia leve CDR3 descrita na SEQ ID NO: 58, em que a numeração é de acordo com Kabat.
2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 40.
3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 58.
4. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 40 e a referida sequência de cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 58.
5. Anticorpo de acordo com uma das reivindicações 1-4, compreendendo adicionalmente um domínio Fc com substituição de aminoácido de S239D, em comparação com a SEQ ID NO: 7, em que a numeração é de acordo com o Index EU como em Kabat.
6. Anticorpo de acordo com uma das reivindicações 1-4, compreendendo adicionalmente um domínio Fc com substituição de aminoácido de I332E, em comparação com a SEQ ID NO: 7, em que a numeração é de acordo com o Index EU como em Kabat.
7. Anticorpo de acordo com uma das reivindicações 1-4, compreendendo adicionalmente um domínio Fc com

substituição de aminoácido de S239D e I332E, em comparação com a SEQ ID NO: 7, em que a numeração é de acordo com o Index EU como em Kabat.

8. Composição compreendendo vários anticorpos glicosilados de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7 em que cerca de 80-100% do anticorpo glicosilado na composição compreende uma estrutura hidrato de carbono de núcleo maduro a qual não possui fucose.
9. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7 e um transportador farmaceuticamente aceitável.
10. Ácido nucleico que codifica uma sequência de cadeia pesada e uma sequência de cadeia leve variável como mencionado em qualquer uma das reivindicações 1-4.
11. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7 ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-9 para uso no tratamento de uma doença ou distúrbio selecionado a partir do grupo que consiste em linfomas não Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfooblástica aguda das células B/linfoma (B-LLA), e linfoma de células do manto (LCM).
12. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7 ou UMa composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-9 para uso no tratamento de uma doença ou distúrbio selecionado a partir do grupo que consiste em artrite reumatóide (AR), lúpus sistémico eritematoso (LSE ou lúpus),

esclerose múltipla, síndrome de Sjögren, e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

Lisboa, 07 de Abril de 2014

Figura 1

CD19 Humano (SEQ ID NO: 1).

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNALQCLKGTSQGLTWSRESPLKPF
LKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLIFINVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGEL
FRWNVSDLGGLGCGKLNRSSSEGPPSGKLMSPKLYWWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL
NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDM
WVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLMSFHLEITARPVLWHVLLRTGGWKVSAVTLAY
LIFCLCSLVGILHLQRALVLRRKRKRMTOPTRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGL
GRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEGEGYEEDSEEDSE
FYENDSNLGQDQLSQDGSGYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFL
SPHGSAWDPSREATSLGSQSYYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNP
GPDPAWGCCCCRMGTWSTR

Figura 2

> Constante Kapa de cadeia leve (Ck) (SEQ ID NO:2)

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

> Constante IgG1 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:3)

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSG  
LYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
RVVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

> Constante IgG2 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:4)

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSG  
LYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKCCVCECPPCPAPPVAGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV  
SVLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

> Constante IgG3 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:5)

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSG  
GLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVELKTPGDTHTOPRCPEPKSCD  
TPPPCPCKPEPKSCDTPPPCKPEPKSCDTPPPCKPEPKSCDTPPCPAPEELLGGPSVFLF  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV  
SVLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

> Constante IgG4 de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:6)

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSG  
LYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV  
SVLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

> Constante Híbrida de cadeia pesada (CH) (SEQ ID NO:7)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSG  
LYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV  
SVLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

> Constante Híbrida de cadeia pesada (CH) com substituições 239D e 332E (SEQ ID NO:8)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSG  
LYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPD  
VFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV  
SVLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Figura 3a

CHS	
EU index	
IgG1	A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G
IgG2	A S T K G P S V F P L A P S S T S S T S S S
IgG3	A S T K G P S V F P L A P S S T S O O
IgG4	A S T K G P S V F P L A P S S T S S T S S S
EU index	
IgG1	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG2	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG3	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG4	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
EU index	
IgG1	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG2	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG3	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG4	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
EU index	
IgG1	S L S S V V T V P S S S L Q T Q T Y I C X
IgG2	S L S S V V T V P S S S L Q T Q T Y S C X
IgG3	S L S S V V T V P S S S L Q T Q T Y S C X
IgG4	S L S S V V T V P S S S L Q T Q T Y S C X
EU index	
IgG1	V N H K P S N T K V D K K V E P K S C
IgG2	V S H K P S N T K V D K V E P K S C
IgG3	V N H K P S N T K V D K V E P K S C
IgG4	V S H K P S N T K V D K V E P K S C
Hinge	
EU index	
IgG1	D K T H T C P P
IgG2	S S
IgG3	S S
IgG4	S S
EU index	
IgG1	
IgG2	
IgG3	
IgG4	
EU index	
IgG1	C P A P E L L O
IgG2	C P A P E L L O
IgG3	C P A P E L L O
IgG4	C P A P S S X G

Figura 3b

CH2	
EU index	237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257
IgG1	G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG2	G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG3	G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG4	G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
EU index	258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278
IgG1	E Y T C V V V D V S H G D P E V K F N W Y
IgG2	E V T C V V V D V S H G D P E V K F N W Y
IgG3	E V T C V V V D V S H G D P E V K F N W Y
IgG4	E V T C V V V D V S H G D P E V K F N W Y
EU index	279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299
IgG1	V D G V S V H N A K T K P R I P O Y N S T
IgG2	V D G V E V H N A K T K P R I P Q N S T
IgG3	V D G V E V H N A K T K P R I P Q N S T
IgG4	V D G V E V H N A K T K P R I P Q N S T
EU index	300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320
IgG1	V R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y X
IgG2	[REDACTED] R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y X
IgG3	[REDACTED] R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y X
IgG4	V R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y X
EU index	321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340
IgG1	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
IgG2	C K V S N K [REDACTED] L P A P I E K T I S K [REDACTED] K
IgG3	C K V S N K A L P A P I E K T I S K F I S K [REDACTED] K
IgG4	C K V S N K [REDACTED] L P [REDACTED] I S K T I S K A K
CH3	
EU index	341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361
IgG1	G Q P R S P Q V Y T L P P S R D E L T K N
IgG2	G Q P R S P Q V Y T L P P S R [REDACTED] T K N
IgG3	G Q P R S P Q V Y T L P P S R [REDACTED] T K N
IgG4	G Q P R S P Q V Y T L P P S R [REDACTED] T K N
EU index	362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382
IgG1	G V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG2	G V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG3	G V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG4	G V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
EU index	383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403
IgG1	S N G Q P R N N Y K T T P P V L D S D G
IgG2	S N G Q P R N N Y K T T P P [REDACTED] L D S D G
IgG3	S [REDACTED] Q P R N N Y K T T P P [REDACTED] L D S D G
IgG4	S N G Q P R N N Y K T T P P V L D S D G
EU index	404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424
IgG1	F F L Y S X L T V D K S R W Q Q N V F S
IgG2	F F L Y S X L T V D K S R W Q Q N V F S
IgG3	F F L Y S X L T V D K S R W Q Q N V F S
IgG4	F F L Y S [REDACTED] L T V D K S R W Q [REDACTED] Q N V F S
EU index	425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445
IgG1	C S V M H S A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG2	C S V M H S A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG3	C S V M H H S A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG4	C S V M H H S A L H N H Y T Q K S L S L S P
EU index	446 447
IgG1	G K
IgG2	G K
IgG3	G K
IgG4	G K

Figura 4a

Alotipo	Alotipo	Posição		
		214	356 358	431
G1m(1,17)	G1m(a,z)	K	D L	A
G1m(1,2,17)	G1m(a,x,z)	K	D L	G
G1m(3)	G1m(l)	R	E M	A
G1m(1,3)	G1m(a,l)	R	D L	A

Figura 4b

Alotipo	Alotipo	Posição	
		282	
G2m(23)	G2m(n ⁺)	V	
	G2m(n-)	M	

Figura 5

Aumento de recetor de ligação	Redução de recetor de ligação	Atividade celular	Atividade terapêutica
Somente I	-	Aumento da atividade da célula dendrítica e absorção, e subsequente apresentação de抗igenios; aumento de monócitos e macrófagos de resposta ao anticorpo	Aumento da resposta imunológica com base nas células contra o alvo
IIIa		Aumento de ADCC e fagocitose de vasta gama de tipos de células	Lise celular aumentada
IIIa	IIb	Aumento de ADCC e fagocitose de vasta gama de tipos de células	Lise celular aumentada
IIb, IIc		Redução da atividade de todos os tipos de células carregando FcR exceto células NK e possível ativação das células NK via sinalização de recetor IIc	Aumento da lise das células alvo seletivo para células alvo acessíveis a células NK
IIb, IIIa	-	Possível ativação específica de células NK de ADCC mediado por célula NK	Aumento da lise das células alvo seletivo para células alvo acessíveis a células NK
IIIb		Aumento de fagócitos mediado por neutrófilo	Destruição aumentada das células alvo para células acessíveis a neutrófilo
Fc α R		Aumento de fagócitos mediado por neutrófilo	Destruição aumentada das células alvo para células acessíveis a neutrófilo
I, IIa, IIIa	IIb	Aumento da atividade das células dendríticas e absorção e subsequente apresentação de抗igenio para as células T; aumento de monócitos e da resposta de macrófagos ao anticorpo	Aumento da resposta imunológica com base celular contra o alvo
IIb	IIIA, iiA, I	Redução na atividade de monócitos, macrófagos, neutrófilos, NK, dendríticas e outra gama de células carregando recetor	Elimina ou reduz a citotoxicidade mediada por células contra células carregando o alvo

Figura 6a

> H0 4G7 (SEQ ID NO:9)
EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYK
NEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDAVYYCARGTYYGSRVFDYWQGTTLTVS
S

> L0 4G7 (SEQ ID NO:10)
DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSLLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASG
VPDRFSGSGSGTAFTRISRVEADVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEK

> H0 HD37 (SEQ ID NO:11)
QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPQDGDT
NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVIDCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
TSVTVSS

> L0 HD37 (SEQ ID NO:12)
DILLTQTPASLAVALGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP
PRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAHYHCQQSTEDPWTFCGGGTKLEIK

Figura 6b

> 4G7 VH CDR1 (SEQ ID NO:132):	SYVMH
> 4G7 VH CDR2 (SEQ ID NO:133):	YINPYNDGTYKNEKFKG
> 4G7 VH CDR3 (SEQ ID NO:134):	GTYYGSRVFDY
> 4G7 VL CDR1 (SEQ ID NO:135):	RSSKSLLNSNGNTYLY
> 4G7 VL CDR2 (SEQ ID NO:136):	RMSNLAS
> 4G7 VL CDR3 (SEQ ID NO:137):	MQHLEYPFT
> HD37 VH CDR1 (SEQ ID NO:138):	SYWMN
> HD37 VH CDR2 (SEQ ID NO:139):	QIWPQDGDTNYNGKFKG
> HD37 VH CDR3 (SEQ ID NO:140):	RETTTVGRYYYAMDY
> HD37 VL CDR1 (SEQ ID NO:141):	KASQSVVDYDGDSYLN
> HD37 VL CDR2 (SEQ ID NO:142):	DASNLV
> HD37 VL CDR3 (SEQ ID NO:143):	QQSTEDPWT

Figure 7

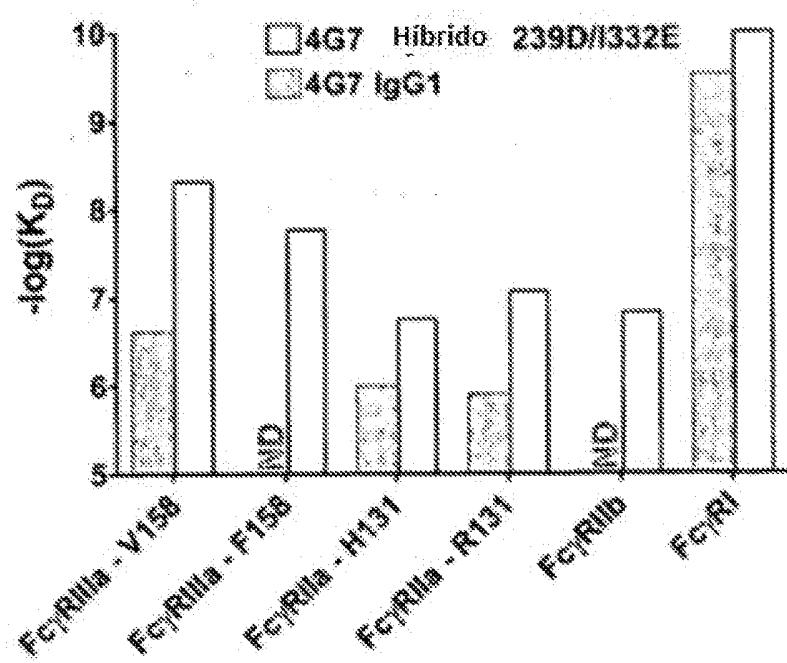


Figura 8a

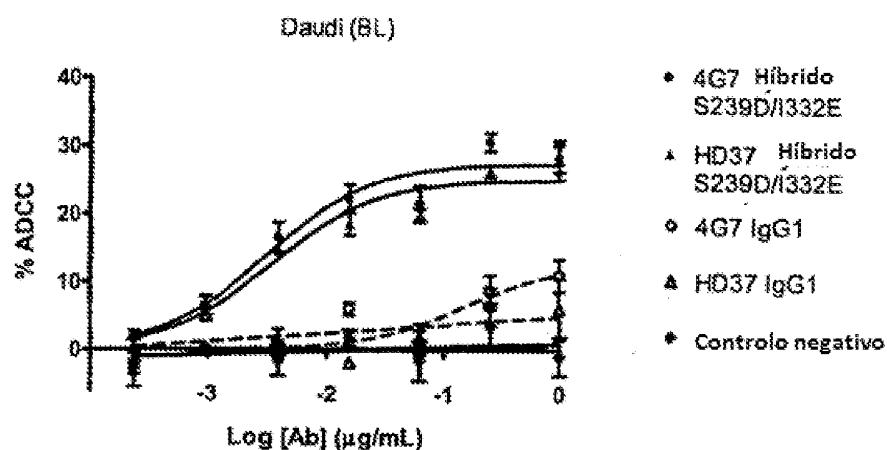


Figura 8b

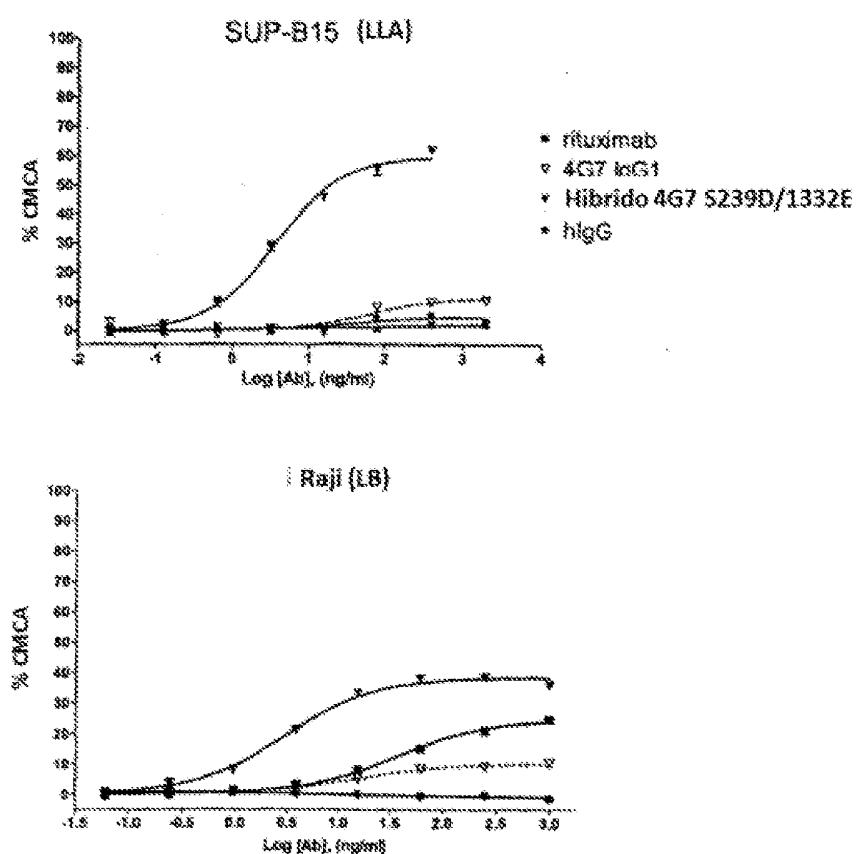


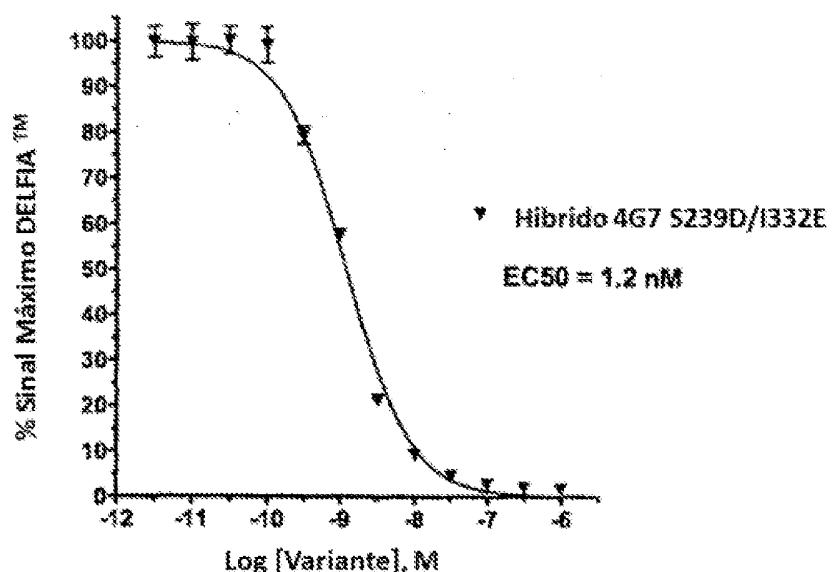
Figura 9**4G7 Ligado nas Células Raji**

Figura 10a

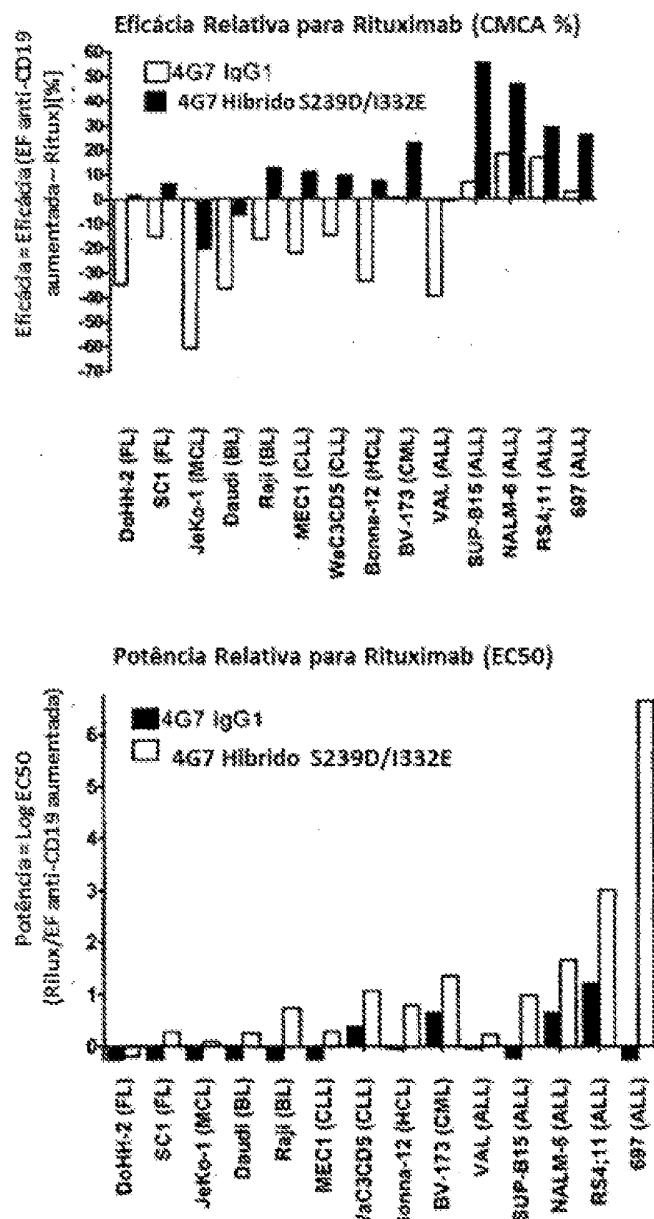


Figura 10b

Tipo de células cancerígenas	Linha de células
Leucemia células pilosas (LCP)	Bonna 12
Leucemia das células do manto (LCM)	Jeko-1
Lencemia Linfocítica Crónica (ANTICORPO GLICOSILADO)	Wac3CD5, MEC-1
Linfoma de Burkitt (LB)	Daudi, Raji
Linfoma Mielogénica Crónica (LMC)	BV-173
Linfoma Folicular (LF)	DoHH.2, SC1
Leucemia Linfooblástica Aguda (LLA)	VAL, SUP-B15, NALM-6, RS4; 11; 697

Figura 11

> H1 4G7 (SEQ ID NO:13)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCCARGTYYYGSRVFDYWGQQTLTVSS

> H2 4G7 (SEQ ID NO:14)

QVQLQESGSGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWMGYINPYNDGTK
YNESLKSRSVTISSDKSISTAYMELSSLRAEDTAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQQTLTVSS

> H3 4G7 (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGYTFTSYVMHWVRQMPGKGLEWMGYINPYNDGTK
YNEKFQGRVTISDKSTSTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQQTLTVSS

> H4 4G7 (SEQ ID NO:16)

EVQLQQSGPEVKPGTSVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLWVWSYINPYNDGTK
YNESLKSRSVTISSDKSISTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQQTLTVSS**Figura 12**

> L1 4G7 (SEQ ID NO:17)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSILLNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> L2 4G7 (SEQ ID NO:18)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTSRSSLNNSNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
GVPDFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDVAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> L3 4G7 (SEQ ID NO:19)

DIVMTQSPATLSVSPGERATISCRSSKSILLNSNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYRMSNLASG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

Figura 13

> H1 HD37 (SEQ ID NO:20)

TVQLVESGGVVRPGGSLRLSCAASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEWIGQIWP GDGDT
NYNGKFQDRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARRETTVGRYYYAMDYWGQGT
LTVSS

> H2 HD37 (SEQ ID NO:21)

QVOLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGYAFSSYWMNWVRQMPGKGLEWMGQIWP GDGDT
TNYNPSLKSRTVTITADESTSTAYMELSSLKAEDTAVYFCARRETTVGRYYYAMDYWGQGT
LTVSS

> H3 HD37 (SEQ ID NO:22)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEWMGQIWP GDGDT
NYNGALKSRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARRETTVGRYYYAMDYWGQGT
LTVSS

> H4 HD37 (SEQ ID NO:23)

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVAQIWP GDGDT
NYADSVKGRFTITADESTSTAYLQMNSLRAGDTAMYFCARRETTVGRYYYAMDYWGQGT
LTVSS

Figura 14

> L1 HD37 (SEQ ID NO:24)

DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASN LVSGI
PPRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

> L2 HD37 (SEQ ID NO:25)

DILLTQSPSSLSVTPGEKVTTICRASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASN LVSGI
PPRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

> L3 HD37 (SEQ ID NO:26)

DILLTQTPLSLPVTPGEPAISCRASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASN LVSGI
PPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

Figura 15a

4G7

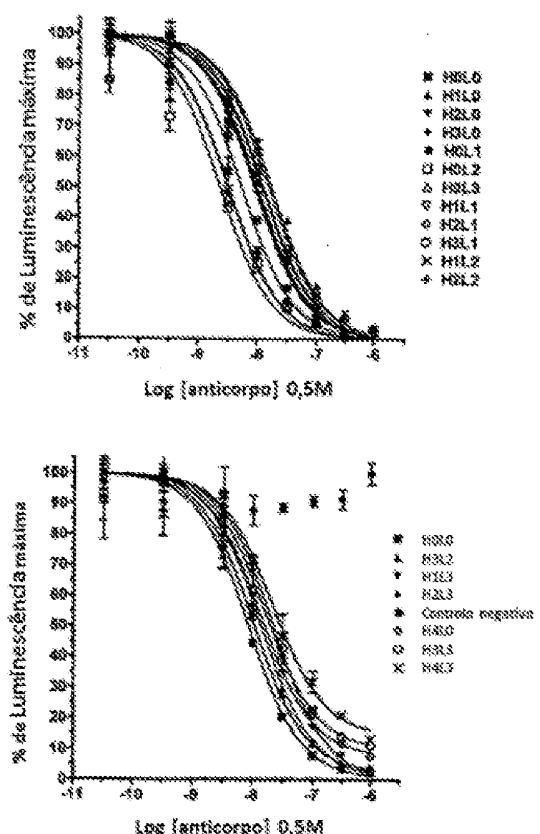


Figura 15b

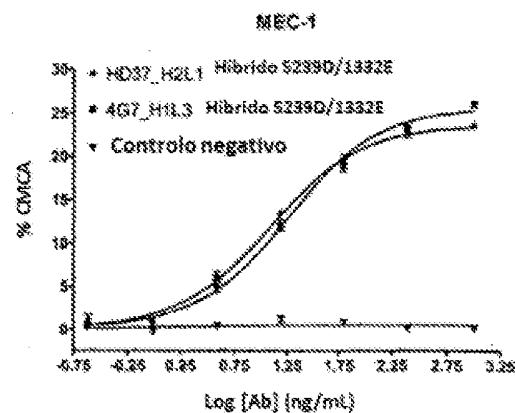


Figura 16

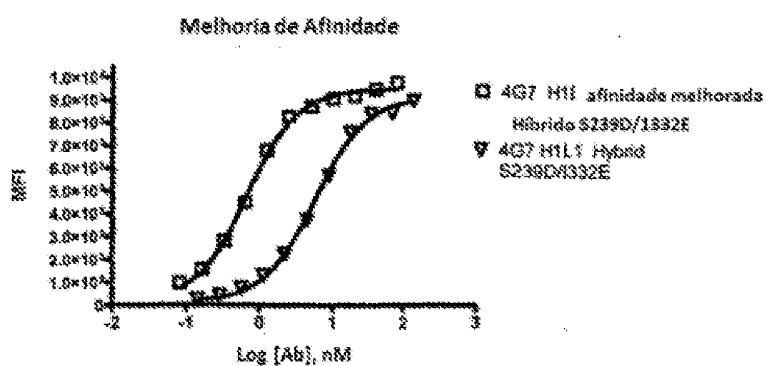


Figura 17

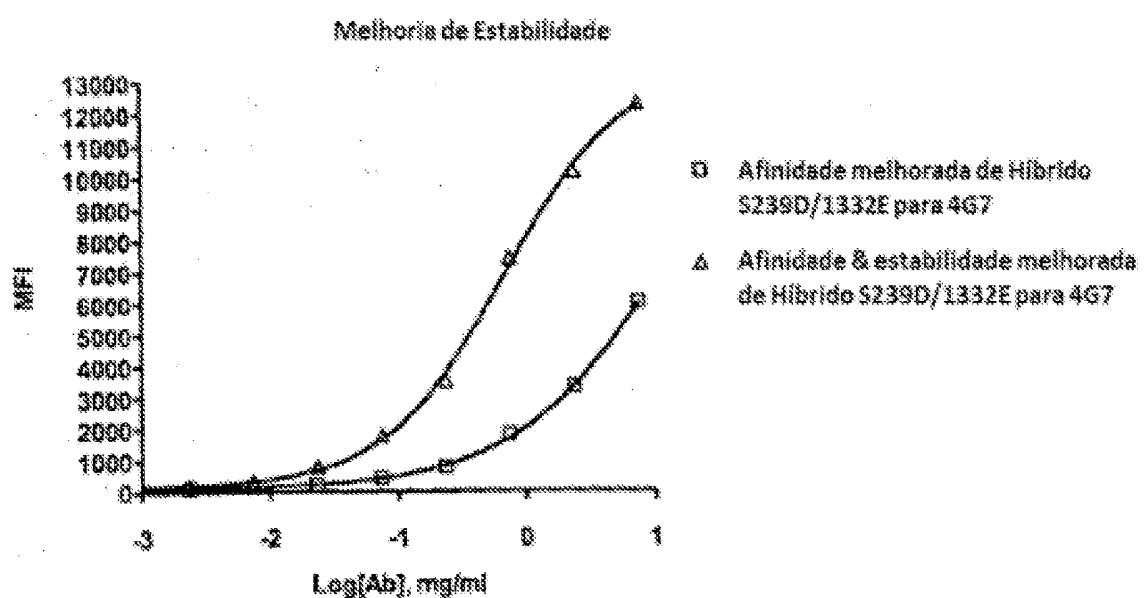


Figura 18

> 4G7 H1.109 (SEQ ID NO:27)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGPKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.113 (SEQ ID NO:28)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNOGHKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.144 (SEQ ID NO:29)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.146 (SEQ ID NO:30)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.147 (SEQ ID NO:31)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGSRVFSYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.191 (SEQ ID NO:32)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGTEY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.192 (SEQ ID NO:33)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGPKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.196 (SEQ ID NO:34)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGPKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.198 (SEQ ID NO:35)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNDGPEY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.201 (SEQ ID NO:36)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNSGTY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.202 (SEQ ID NO:37)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNEGTY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

> 4G7 H1.203 (SEQ ID NO:38)
EVQLVESGGGLVKPQGSKLKSCAASGYTFTSYVMHHVROAPGKGLEWIGYINPYNSGTEY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQGTLTVSS

Figura 18 (Continuação)

> 4G7 H1.204 (SEQ ID NO:39)
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNEGTEY
NEKFQGRVTISOKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCARGTYYGTRVFDYWQQGTLTVSS

> 4G7 H1.52 (SEQ ID NO:40)
EVOLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISOKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCARGTYYGTRVFDYWQQGTLTVSS

> 4G7 H1.60 (SEQ ID NO:41)
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISOKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCARGTYYGLRVFDYWQQGTLTVSS

> 4G7 H1.62 (SEQ ID NO:42)
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISOKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCARGTYYGSEVFDYWQQGTLTVSS

> 4G7 H1.65 (SEQ ID NO:43)
EVQI VFSGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTY
NEKFQGRVTISOKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCARGTYYGSSVFDYWQQGTLTVSS

> 4G7 H1.76 (SEQ ID NO:44)
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNAGTY
NEKFQGRVTISOKSISTAYMELSSLRSEDTAMYCARGTYYGSRVFDYWQQGTLTVSS

Figura 19

> 4G7 L1.11 (SEQ ID NO:45)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLNYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.124 (SEQ ID NO:46)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNWAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.138 (SEQ ID NO:47)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNVNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.139 (SEQ ID NO:48)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNVNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.141 (SEQ ID NO:49)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.143 (SEQ ID NO:50)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.144 (SEQ ID NO:51)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.145 (SEQ ID NO:52)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.146 (SEQ ID NO:53)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNVNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.148 (SEQ ID NO:54)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.149 (SEQ ID NO:55)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNSNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.152 (SEQ ID NO:56)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLQNVNGNTYLWFOQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

Figura 19 (Continuação)

> 4G7 L1.154 (SEQ ID NO:57)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.155 (SEQ ID NO:58)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.160 (SEQ ID NO:59)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.161 (SEQ ID NO:60)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.162 (SEQ ID NO:61)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.163 (SEQ ID NO:62)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.164 (SEQ ID NO:63)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.17 (SEQ ID NO:64)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.19 (SEQ ID NO:65)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.26 (SEQ ID NO:66)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.3 (SEQ ID NO:67)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.32 (SEQ ID NO:68)

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNNGNTYLWFOOKPGQSPQLIYRMSNLNS
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSEPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

Figura 19 | (Continuação)

> 4G7 L1.46 (SEQ ID NO:69)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSHLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.54 (SEQ ID NO:70)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSGLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.55 (SEQ ID NO:71)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSYLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.64 (SEQ ID NO:72)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.67 (SEQ ID NO:73)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPVTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.68 (SEQ ID NO:74)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPNTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.8 (SEQ ID NO:75)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMKNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.80 (SEQ ID NO:76)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.9 (SEQ ID NO:77)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMLNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.92 (SEQ ID NO:78)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLAS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

> 4G7 L1.95 (SEQ ID NO:79)
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLLNSNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFAVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLEIK

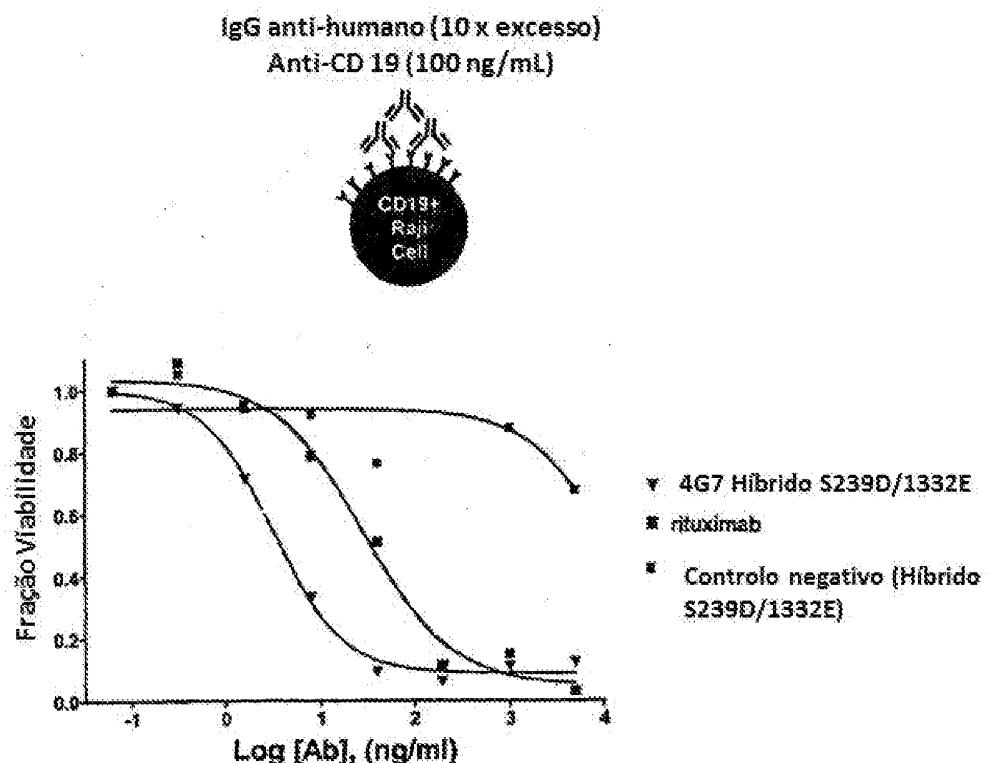
Figura 20

Figura 21
Ligação cruzada com um anti-Fc mAb secundária

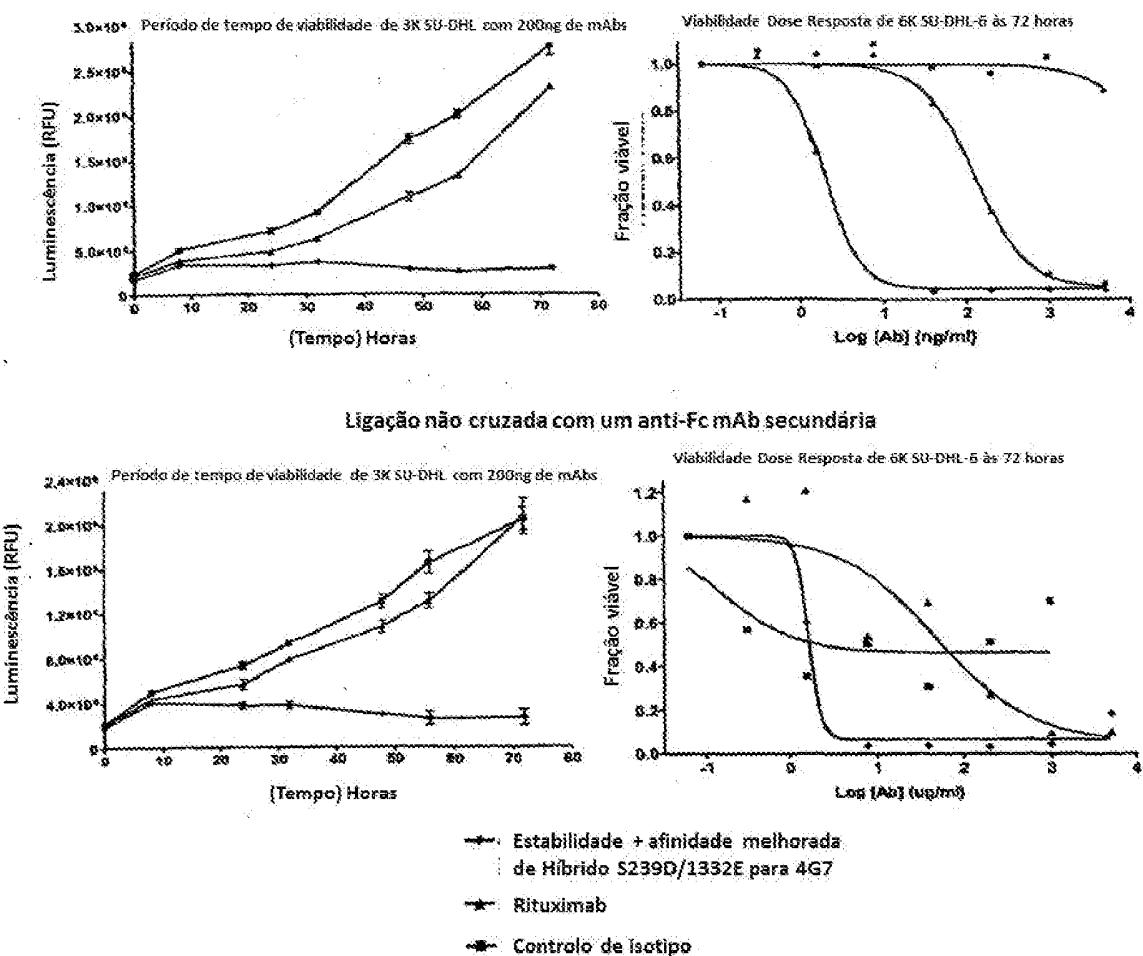


Figura 22

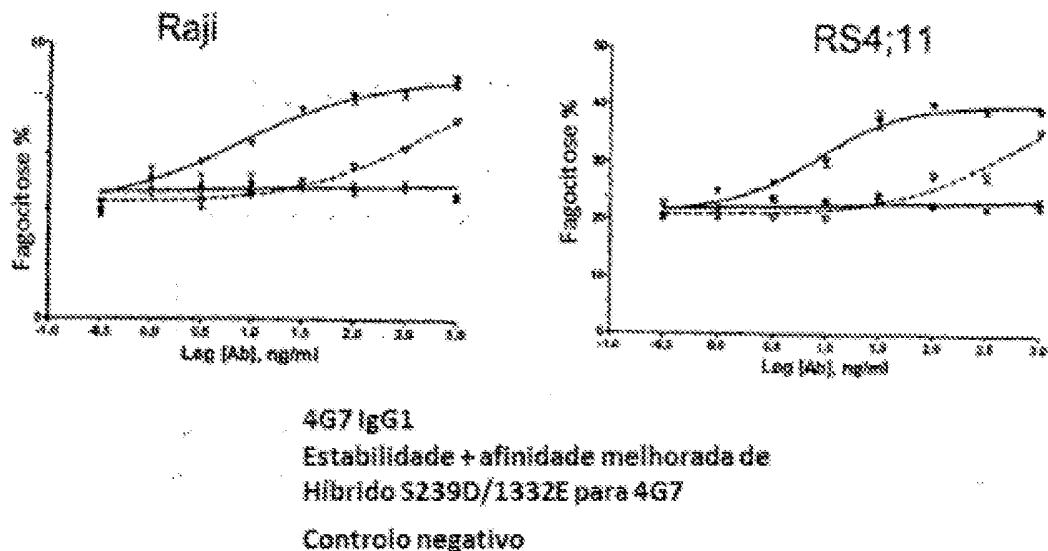


Figura 23

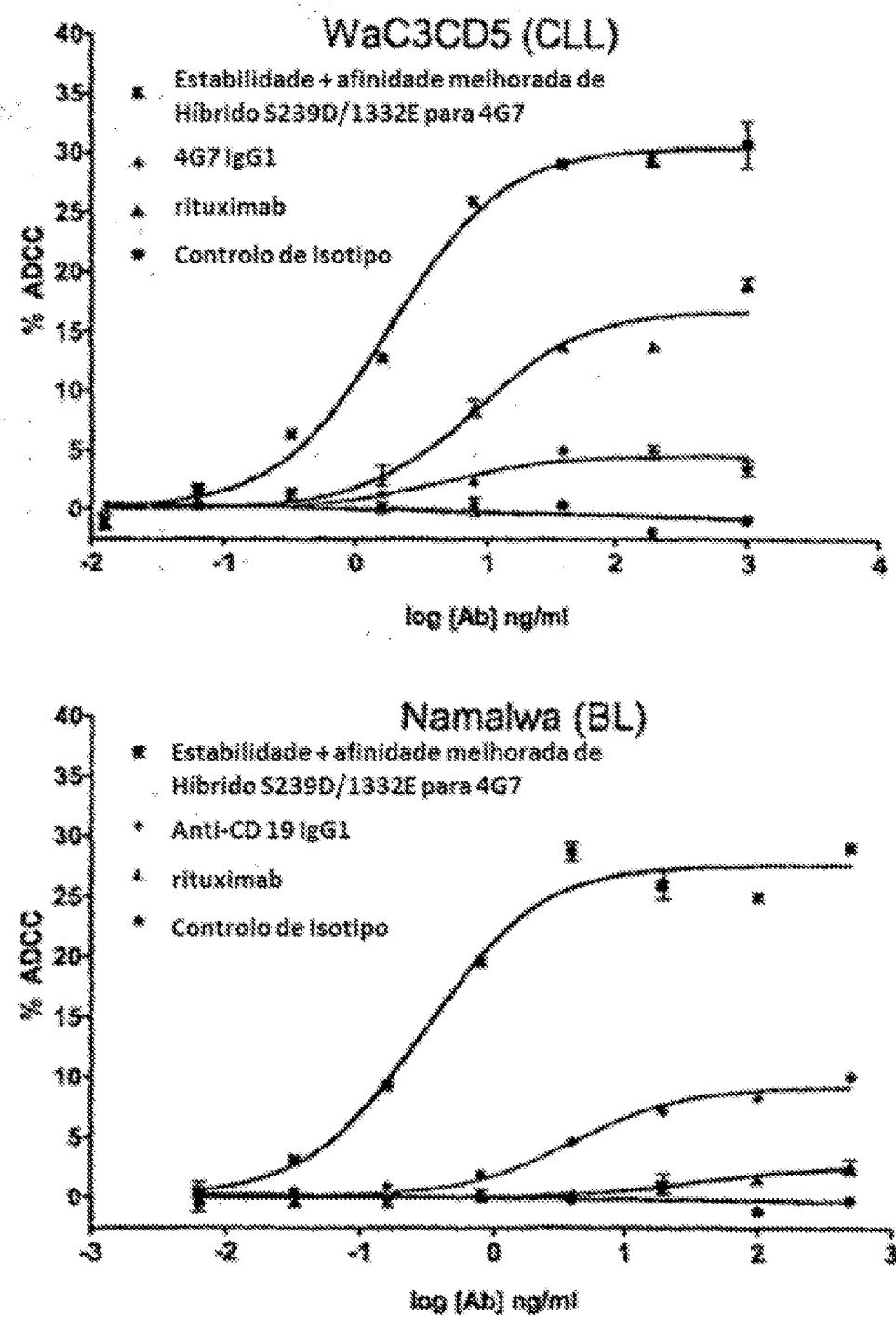


Figura 23 (continuação)

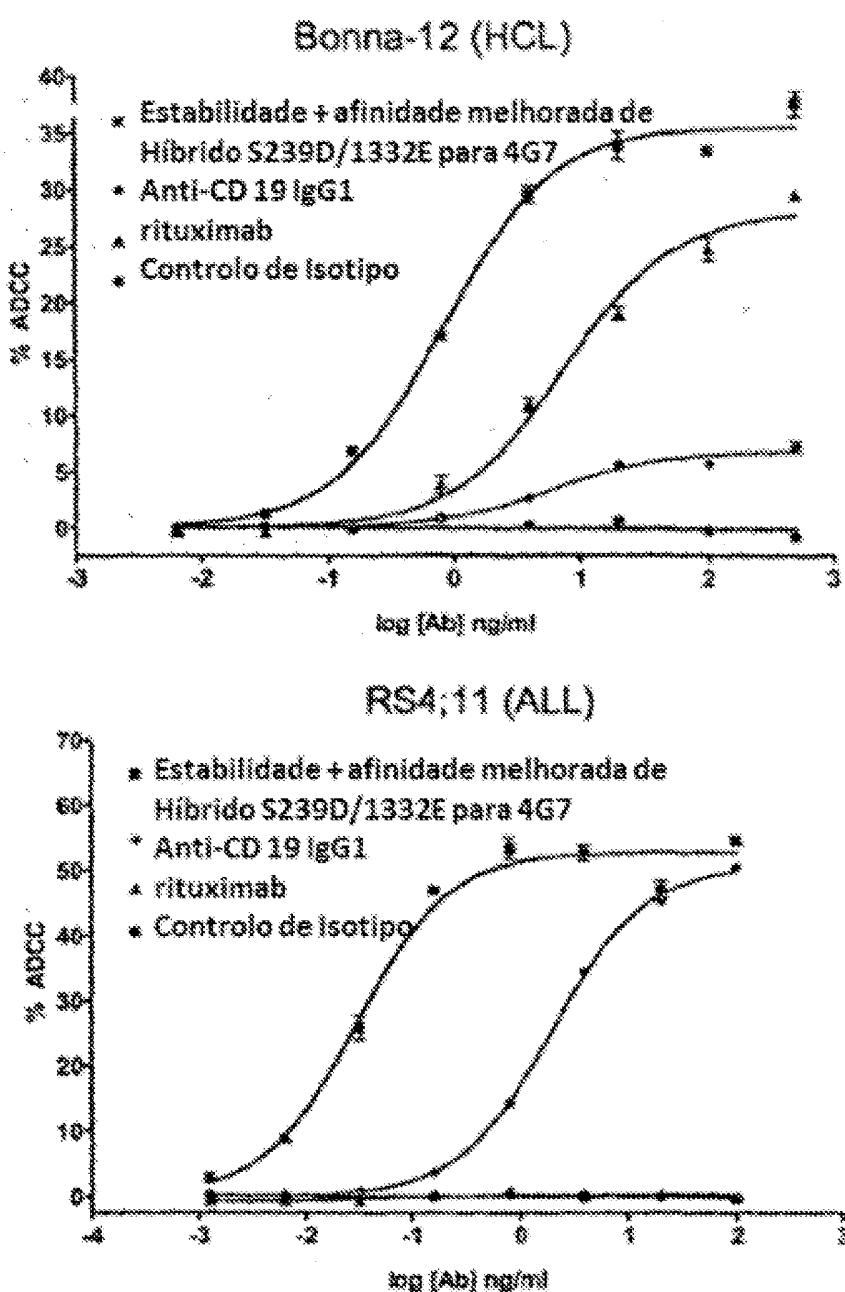
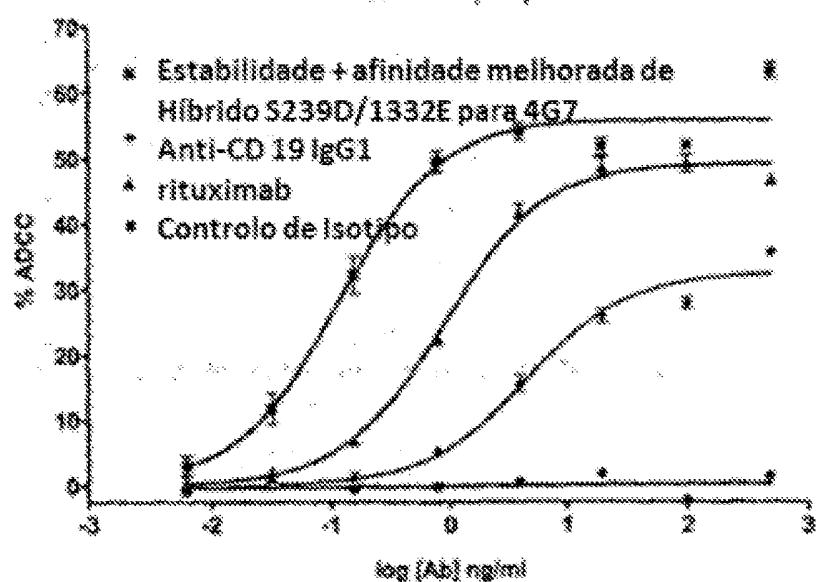


Figura 23 (continuação)

Ramos (BL)



BV-173 (CML)

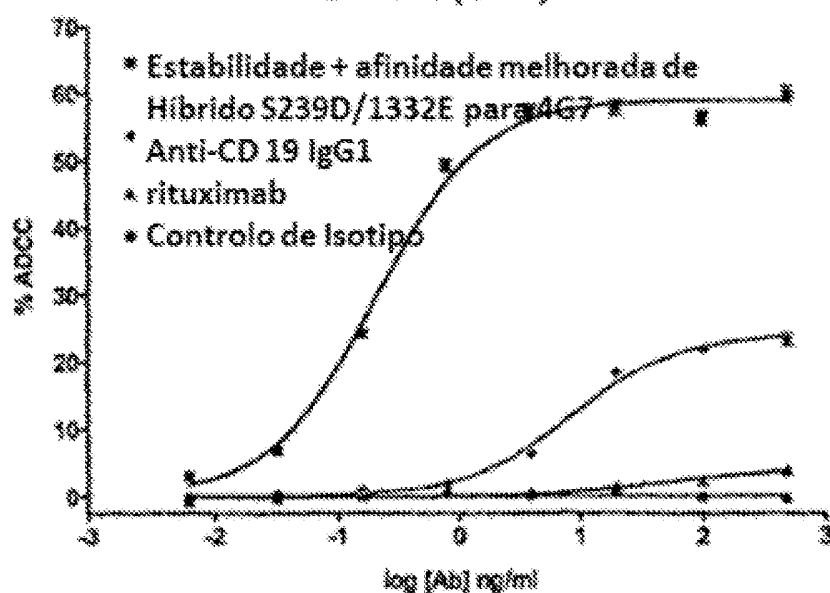


Figura 24

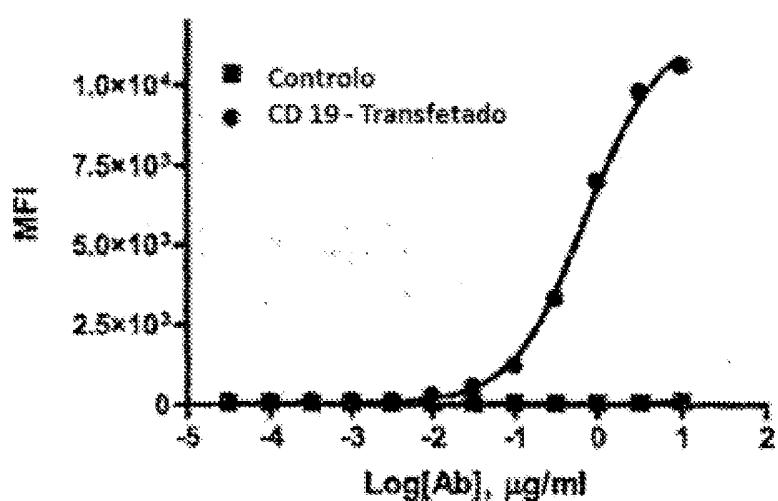


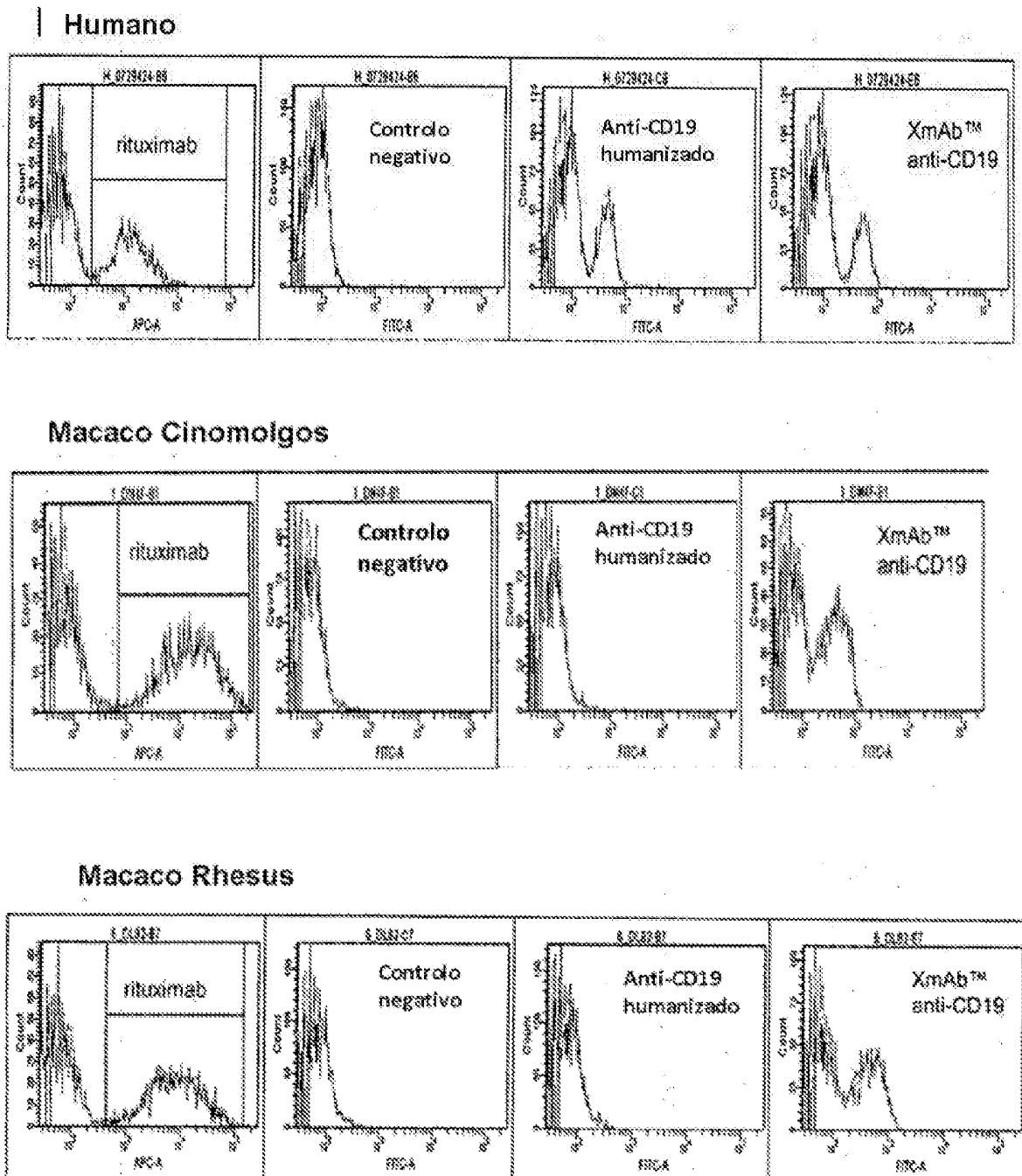
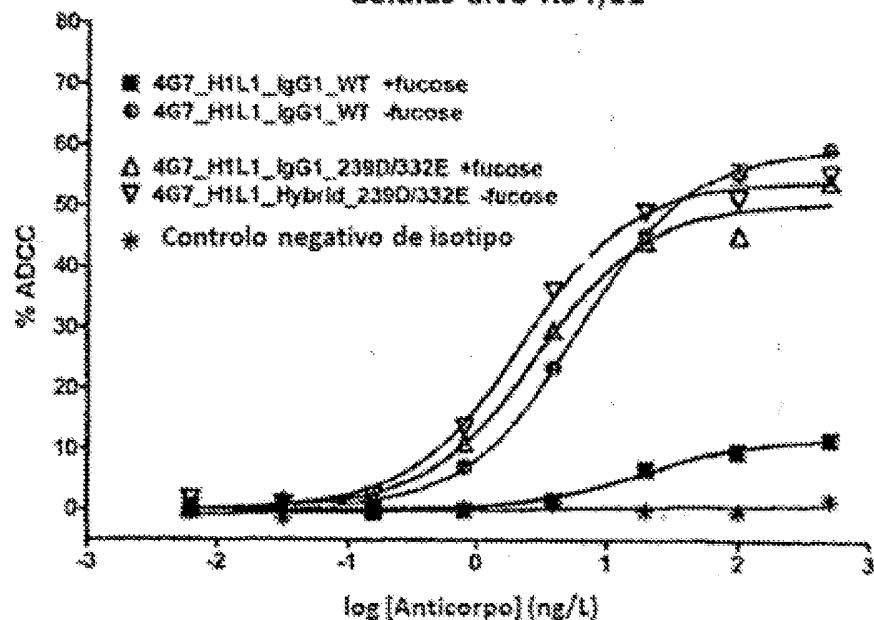
Figura 25

Figura 26

Células alvo RS4;11



Células alvo MEC-1

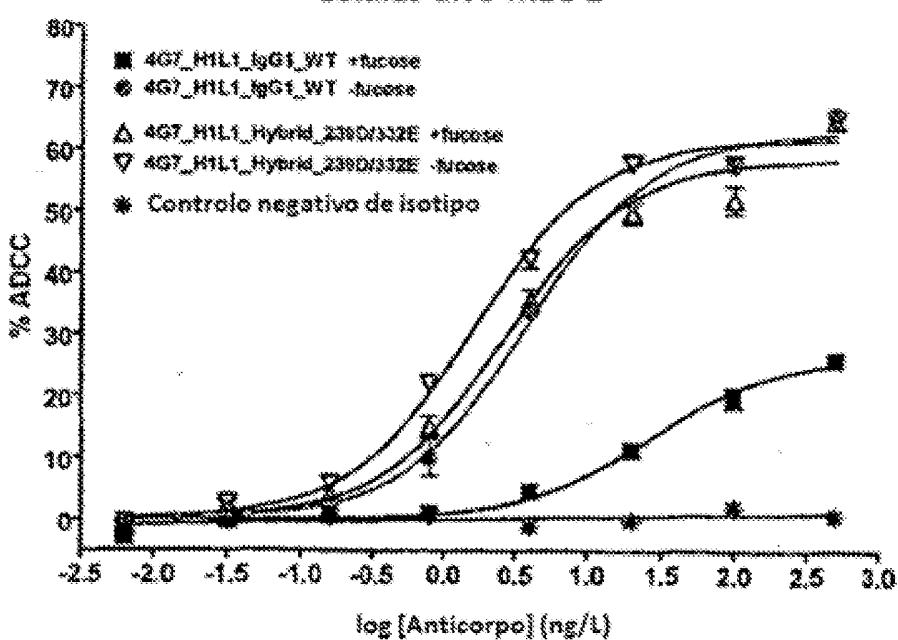


Figura 27

Cadeia Pesada												Cadeia Leve													
Kabel	Variante	CSR-33						CSR-34						CSR-35						CSR-36					
		33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-33	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-34	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-35	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-36	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-33	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-34	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-35	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38
Kabel	CSR-36	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38	33	34	35	36	37	38

Figura 28

Modelo		Variantes (numeração Kabat)				
		Cadeia pesada		Cadeia leve		
Cadeia pesada	Cadeia leve	1	2	3	4	5
H3.1	L0	V27F				
H3.10	L0	Y34H				
H3.11	L0	V38F				
H3.12	L0	V38T				
H3.13	L0	H358N				
H3.14	L0	H358Y				
H3.15	L0	W47F				
H3.18	L0	Y50F				
H3.17	L0	Y50H				
H3.16	L0	N52D				
H3.19	L0	N52S				
H3.2	L0	Y27H				
H3.20	L0	P52eS				
H3.21	L0	P52eA				
H3.22	L0	N54D				
H3.23	L0	N54S				
H3.24	L0	D55E				
H3.25	L0	D55S				
H3.26	L0	G56A				
H3.27	L0	G56N				
H3.28	L0	T57A				
H3.29	L0	T57S				
H3.3	L0	T28A				
H3.30	L0	K58R				
H3.31	L0	K58Q				
H3.32	L0	Y58F				
H3.33	L0	Y58H				
H3.34	L0	G58A				
H3.35	L0	G58S				
H3.36	L0	T58A				
H3.37	L0	T58S				
H3.38	L0	Y67F				
H3.39	L0	Y67H				
H3.4	L0	T28S				
H3.40	L0	Y58F				
H3.41	L0	Y58H				
H3.42	L0	Y58F				
H3.43	L0	Y58H				
H3.44	L0	G100SA				
H3.45	L0	G100SS				
H3.46	L0	S100CA				
H3.47	L0	S100SH				
H3.48	L0	R100AK				
H3.49	L0	R100AQ				
H3.5	L0	T28A				
H3.50	L0	V100SH				
H3.51	L0	F100L				

Figura 28 (continuação)

Variantes (númeração Kabati)

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)									
Modelo		Cadeia parada					Cadeia leve		
Cadeia parada	Cadeia leve	1	2	3	4	1	2	3	4
H1.153	L1	D101L							
H1.154	L1	D101T							
H1.155	L1	D101G							
H1.156	L1	D101Y							
H1.157	L1	Y34Z							
H1.158	L1	Y34L							
H1.159	L1	Y34W							
H1.160	L1	Y34V							
H1.161	L1	Y34A							
H1.162	L1	Y34N							
H1.163	L1	Y34Q							
H1.164	L1	Y34K							
H1.165	L1	Y36P							
H1.166	L1	Y36R							
H1.167	L1	Y36W							
H1.168	L1	Y36V							
H1.169	L1	Y36A							
H1.170	L1	Y36S							
H1.171	L1	Y36Q							
H1.172	L1	Y36K							
H1.173	L1	G36E							
H1.174	L1	G36L							
H1.175	L1	G36Q							
H1.176	L1	G36H							
H1.177	L1	G36P							
H1.178	L1	G36V							
H1.179	L1	G36Y							
H1.180	L1	G36K							
H1.181	L1	Y102F							
H1.182	L1	Y102H							
H1.183	L1	Y102P							
H1.184	L1	Y102L							
H1.185	L1	Y102W							
H1.186	L1	Y102V							
H1.187	L1	Y102A							
H1.188	L1	Y102N							
H1.189	L1	Y102Q							
H1.190	L1	Y102K							
H1.191	L1	K58E	S100cT						
H1.192	L1	T57P	S100cT						
H1.193	L1	K58E	R100cS						
H1.194	L1	T57P	R100cS						
H1.195	L1	S100cT	R100cS						
H1.196	L1	T57P	S100cT	R100cS					
H1.197	L1	T57P	K58E	S100cT	R100cS				
H1.198	L1	T57P	K58E	S100cT	R100cS				
H1.199	L1	T57P	K58E	S100cT	R100cS				
H1.200	L1	T57P	K58E						

Figura 28 (continuación)

Variantes (nomenclatura Rabat)

Figura 28 (continuação)

Modelos		Cadeia pesada				Variantes (numerização Kabat)				
Cadeia pesada	Cadeia Leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.99	L1	P54E								
H3.117	L1	PS28L								
H3.118	L1	PS28N								
H3.119	L1	PS28T								
H3.120	L3	PS28V								
H3.121	L3	PS28Y								
H3.122	L3	PS2aQ								
H3.123	L3	PS2aN								
H3.124	L3	PS2aH								
H3.125	L3	PS2aG								
H3.126	L3	PS2aF								
H3.127	L3	PS2aK								
H1	L1.1					S52T				
H1	L1.10					S52Y				
H1	L1.100					S52P				
H1	L1.101					S58Q				
H1	L1.102					S58G				
H1	L1.103					S58N				
H1	L1.104					S58V				
H1	L1.105					S58H				
H1	L1.106					S58E				
H1	L1.107					S58K				
H1	L1.108					S58L				
H1	L1.109					S58T				
H1	L1.11					E93H				
H1	L1.110					S27aT				
H1	L1.111					S27aP				
H1	L1.112					S27aQ				
H1	L1.113					S27aG				
H1	L1.114					S27aV				
H1	L1.115					S27aH				
H1	L1.116					S27aE				
H1	L1.117					S27aK				
H1	L1.118					S27aS				
H1	L1.119					S27aY				
H1	L1.12					E93K				
H1	L1.120					L54I				
H1	L1.121					L54P				
H1	L1.122					L54F				
H1	L1.123					L54Y				
H1	L1.124					L54W				
H1	L1.125					L54D				
H1	L1.126					L54S				
H1	L1.127					L54H				
H1	L1.128					L54Q				
H1	L1.129					L54N				
H1	L1.13					E93S				

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo	Cadeia pesada	Cadeia leve	Cadeia pesada				Cadeia leve				
			1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1	L1.130						Y48P				
H1	L1.131						Y49L				
H1	L1.132						Y48W				
H1	L1.133						Y48V				
H1	L1.134						Y48A				
H1	L1.135						Y48N				
H1	L1.136						Y48Q				
H1	L1.137						Y48R				
H1	L1.138						S27eV	ASSN			
H1.138	L1.138	T57P					S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	K58E	S100cT				S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	T57P	S100cT				S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	S100cT	R100eS				S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	T57P	S100cT	R100eS			S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	T57P	K58E	S100cT	R100eS		S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	T57P	K58E	S100cT	R100eS		S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	T57P	K58E	S100cT	R100eS		S27eV	ASSN			
H1.139	L1.138	S100cT					S27eV	ASSN			
H1	L1.139						S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	T57P					S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	K58E	S100cT				S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	T57P	S100cT				S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	K58E	R100eS				S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	T57P	R100eS				S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	S100cT	R100eS				S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	T57P	S100cT	R100eS			S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	T57P	K58E	S100cT	R100eS		S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	T57P	K58E	S100cT	R100eS		S27eV	F88N			
H1.139	L1.139	S100cT					S27eV	F88N			
H1	L1.140						E89H				
H1	L1.140						S27eV	F88N			
H1.139	L1.140	T57P					S27eV	F88N			
H1.139	L1.140	K58E	S100cT				S27eV	F88N			
H1.139	L1.140	T57P	S100cT				S27eV	F88N			
H1.139	L1.140	S100cT					S27eV	F88N			
H1	L1.141						ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	T57P					ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	K58E	S100cT				ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	T57P	S100cT				ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	S100cT					ASSN	F88N			
H1	L1.141						ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	T57P					ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	K58E	S100cT				ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	T57P	S100cT				ASSN	F88N			
H1.139	L1.141	S100cT					ASSN	F88N			
H1	L1.142						ASSN	F88			
H1.139	L1.142	T57P					ASSN	F88			

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo	Cadeia pesada	Cadeia pesada				Cadeia leve				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.191	L1.142	K38E	S100CT			A55N	F95I			
H1.192	L1.142	T57P	S100CT			A55N	F95I			
H1.193	L1.142	K38E	R100CS			A55N	F95I			
H1.194	L1.142	T57P	R100CS			A55N	F95I			
H1.195	L1.142	S100CT				A55N	F95I			
H1	L1.143					L27eQ	A55N			
H1.196	L1.143	T57P				L27eQ	A55N			
H1.197	L1.143	K38E	S100CT			L27eQ	A55N			
H1.198	L1.143	T57P	S100CT			L27eQ	A55N			
H1.199	L1.143	S100CT	R100CS			L27eQ	A55N			
H1.200	L1.143	T57P	S100CT	R100CS		L27eQ	A55N			
H1.201	L1.143	K38E	S100CT	R100CS		L27eQ	A55N			
H1.202	L1.143	T57P	K38E	S100CT	R100CS	L27eQ	A55N			
H1.203	L1.143	T57P	K38E	S100CT		L27eQ	A55N			
H1.204	L1.143	S100CT				L27eQ	A55N			
H1	L1.144					L27eQ	F95N			
H1.199	L1.144	T57P				L27eQ	F95N			
H1.201	L1.144	K38E	S100CT			L27eQ	F95N			
H1.202	L1.144	T57P	S100CT			L27eQ	F95N			
H1.203	L1.144	K38E	R100CS			L27eQ	F95N			
H1.204	L1.144	T57P	R100CS			L27eQ	F95N			
H1.205	L1.144	S100CT	R100CS			L27eQ	F95N			
H1.196	L1.144	T57P	S100CT	R100CS		L27eQ	F95N			
H1.198	L1.144	T57P	K38E	S100CT	R100CS	L27eQ	F95N			
H1.199	L1.144	T57P	K38E	S100CT		L27eQ	F95N			
H1.202	L1.144	S100CT				L27eQ	F95N			
H1	L1.145					L27eQ	F95I			
H1.199	L1.145	T57P				L27eQ	F95I			
H1.201	L1.145	K38E	S100CT			L27eQ	F95I			
H1.202	L1.145	T57P	S100CT			L27eQ	F95I			
H1.204	L1.145	S100CT				L27eQ	F95I			
H1	L1.146					S27eV	A55N	F95N		
H1.199	L1.146	T57P				S27eV	A55N	F95N		
H1.201	L1.146	K38E	S100CT			S27eV	A55N	F95N		
H1.202	L1.146	T57P	S100CT			S27eV	A55N	F95N		
H1.203	L1.146	K38E	R100CS			S27eV	A55N	F95N		
H1.204	L1.146	T57P	R100CS			S27eV	A55N	F95N		
H1.205	L1.146	S100CT	R100CS			S27eV	A55N	F95N		
H1.206	L1.146	T57P	S100CT	R100CS		S27eV	A55N	F95N		
H1.208	L1.146	T57P	K38E	S100CT	R100CS	S27eV	A55N	F95N		
H1.209	L1.146	T57P	K38E	S100CT		S27eV	A55N	F95N		
H1.202	L1.146	S100CT				S27eV	A55N	F95N		
H1	L1.147					S27eV	A55N	F95I		
H1.199	L1.147	T57P				S27eV	A55N	F95I		
H1.201	L1.147	K38E	S100CT			S27eV	A55N	F95I		
H1.202	L1.147	T57P	S100CT			S27eV	A55N	F95I		
H1.203	L1.147	K38E	R100CS			S27eV	A55N	F95I		
H1.204	L1.147	T57P	R100CS			S27eV	A55N	F95I		

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo	Cadeia pesada	Cadeia pesada				Cadeia Leve				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.52	L1.147	S100ct				S27ev	A55N	F55I		
H1	L1.148					L27eQ	A55N	F55N		
H1.159	L1.148	T57P				L27eQ	A55N	F55N		
H1.161	L1.148	K58E	S100ct			L27eQ	A55N	F55N		
H1.162	L1.148	T57P	S100ct			L27eQ	A55N	F55N		
H1.163	L1.148	K58E	R100ds			L27eQ	A55N	F55N		
H1.164	L1.148	T57P	R100ds			L27eQ	A55N	F55N		
H1.165	L1.148	S100ct	R100ds			L27eQ	A55N	F55N		
H1.166	L1.148	T57P	S100ct	R100ds		L27eQ	A55N	F55N		
H1.168	L1.148	T57P	K58E	S100ct	R100ds	L27eQ	A55N	F55N		
H1.169	L1.148	T57P	K58E	S100ct		L27eQ	A55N	F55N		
H1.52	L1.148	S100ct				L27eQ	A55N	F55N		
H1	L1.149					L27eQ	A55N	F55I		
H1.169	L1.149	T57P				L27eQ	A55N	F55I		
H1.161	L1.149	K58E	S100ct			L27eQ	A55N	F55I		
H1.162	L1.149	T57P	S100ct			L27eQ	A55N	F55I		
H1.163	L1.149	K58E	R100ds			L27eQ	A55N	F55I		
H1.164	L1.149	T57P	R100ds			L27eQ	A55N	F55I		
H1.52	L1.149	S100ct				L27eQ	A55N	F55I		
H1	L1.150					E55R				
H1	L1.150					L27eQ	S27ev			
H1	L1.151					L27eQ	S27ev	A55N		
H1.162	L1.151	T57P	S100ct			L27eQ	S27ev	A55N		
H1.165	L1.151	S100ct	R100ds			L27eQ	S27ev	A55N		
H1.166	L1.151	T57P	S100ct	R100ds		L27eQ	S27ev	A55N		
H1.168	L1.151	T57P	K58E	S100ct	R100ds	L27eQ	S27ev	A55N		
H1.169	L1.151	T57P	K58E	S100ct		L27eQ	S27ev	A55N		
H1.52	L1.151	S100ct				L27eQ	S27ev	A55N		
H1	L1.152					L27eQ	S27ev	F55N		
H1.162	L1.152	T57P	S100ct			L27eQ	S27ev	F55N		
H1.166	L1.152	S100ct	R100ds			L27eQ	S27ev	F55N		
H1.168	L1.152	T57P	S100ct	R100ds		L27eQ	S27ev	F55N		
H1.169	L1.152	T57P	K58E	S100ct	R100ds	L27eQ	S27ev	F55N		
H1.52	L1.152	S100ct				L27eQ	S27ev	F55N		
H1	L1.153					L27eQ	S27ev	F55I		
H1	L1.154					L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1.162	L1.154	T57P	S100ct			L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1.163	L1.154	S100ct	R100ds			L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1.166	L1.154	T57P	S100ct	R100ds		L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1.168	L1.154	T57P	K58E	S100ct	R100ds	L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1.169	L1.154	T57P	K58E	S100ct		L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1.52	L1.154	S100ct				L27eQ	S27ev	A55N	F55N	
H1	L1.155					L27eQ	S27ev	A55N	F55I	
H1.161	L1.155	K58E	S100ct			L27eQ	S27ev	A55N	F55I	
H1.201	L1.155	D55S	S100ct			L27eQ	S27ev	A55N	F55I	
H1.203	L1.155	D55S	K58E	S100ct		L27eQ	S27ev	A55N	F55I	

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia leve				
Cadeia pesada	Cadeia leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.152	L1.155	S100cT				L27cQ	S27eV	A55N	F95I	
H1	L1.16					E93P				
H1.181	L1.160	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G28A	A55N	F95I
H1.201	L1.160	D58S	S100cT			L27cQ	S27eV	G28A	A55N	F95I
H1.202	L1.160	D58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G28A	A55N	F95I
H1.203	L1.160	D58S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G28A	A55N	F95I
H1.204	L1.160	D58E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G28A	A55N	F95I
H1.32	L1.160	S100cT				L27cQ	S27eV	G28A	A55N	F95I
H1.181	L1.161	K58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G28S	A55N	F95I
H1.201	L1.161	D58S	S100cT			L27cQ	S27eV	G28S	A55N	F95I
H1.202	L1.161	D58E	S100cT			L27cQ	S27eV	G28S	A55N	F95I
H1.203	L1.161	D58S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G28S	A55N	F95I
H1.204	L1.161	D58E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eV	G28S	A55N	F95I
H1.52	L1.161	S100cT				L27cQ	S27eV	G28S	A55N	F95I
H1.181	L1.162	K58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G28A	A55N	F95I
H1.201	L1.162	D58S	S100cT			L27cQ	S27eA	G28A	A55N	F95I
H1.202	L1.162	D58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G28A	A55N	F95I
H1.203	L1.162	D58S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G28A	A55N	F95I
H1.204	L1.162	D58E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G28A	A55N	F95I
H1.52	L1.162	S100cT				L27cQ	S27eA	G28A	A55N	F95I
H1.181	L1.163	K58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G28S	A55N	F95I
H1.201	L1.163	D58S	S100cT			L27cQ	S27eA	G28S	A55N	F95I
H1.202	L1.163	D58E	S100cT			L27cQ	S27eA	G28S	A55N	F95I
H1.203	L1.163	D58S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G28S	A55N	F95I
H1.204	L1.163	D58E	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	G28S	A55N	F95I
H1.52	L1.163	S100cT				L27cQ	S27eA	G28S	A55N	F95I
H1.201	L1.164	D58S	S100cT			L27cQ	S27eA	A55N	F95I	
H1.203	L1.164	D58S	K58E	S100cT		L27cQ	S27eA	A55N	F95I	
H1	L1.17					E93T				
H1	L1.18					E93S				
H1	L1.19					E94Y				
H1	L1.20					S55P				
H1	L1.21					L27cP				
H1	L1.22					L27cF				
H1	L1.23					L27cY				
H1	L1.24					L27cW				
H1	L1.25					S27eH				
H1	L1.26					L27cS				
H1	L1.27					L27cO				
H1	L1.28					L27cK				
H1	L1.29					S27eT				
H1	L1.30					S27eP				
H1	L1.31					S27eQ				
H1	L1.32					S27eG				
H1.108	L1.32	T97P				S27eV				

Figura 28 (continuação)

Variantes (nomenclatura Kabat)

Modelo		Cadeia pesada				Cadeia leve				
Cadeia pesada	Cadeia leve	1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.32	L1.32	S100eT				S27eV				
H1	L1.33					S27eH				
H1	L1.34					S27eE				
H1	L1.35					S27eK				
H1	L1.36					S27eY				
H1	L1.37					LS2P				
H1	L1.38					LS2F				
H1	L1.39					LS2Y				
H1	L1.4					S3eG				
H1	L1.40					LS2W				
H1	L1.41					LS2N				
H1	L1.42					LS2S				
H1	L1.43					LS2H				
H1	L1.44					LS2O				
H1	L1.45					LS2K				
H1	L1.46					N33H				
H1	L1.47					N33E				
H1	L1.48					N33Q				
H1	L1.49					N33P				
H1	L1.5					S32V				
H1	L1.50					N33R				
H1	L1.51					N33A				
H1	L1.52					N33L				
H1	L1.53					N33T				
H1	L1.54					N33S				
H1	L1.55					N33Y				
H1	L1.56					K27e				
H1	L1.57					K27H				
H1	L1.58					K27P				
H1	L1.59					K27T				
H1	L1.6					K27D				
H1	L1.60					S32H				
H1	L1.61					K27P				
H1	L1.62					K27T				
H1	L1.63					K27Y				
H1	L1.64					F33W				
H1.181	L1.64	X36E	S100eT			F33I				
H1.182	L1.64	T37P	S100eT			F33J				
H1	L1.65					F33A				
H1	L1.66					F33P				
H1	L1.67					F33V				
H1	L1.68					F33N				
H1.183	L1.68	T37P								
H1.181	L1.68	K36E	S100eT			F33N				
H1.182	L1.68	T37P	S100eT			F33N				
H1.183	L1.68	S100eT	R100eS			F33N				
H1.186	L1.68	T37P	S100eT	R100eS		F33N				

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo	Cadeia pesada	Cadeias pesadas				Cadeias leves				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5
H1.198	L1.68	T57P	K58E	S100ET	R100RS	F88N				
H1.198	L1.68	T57P	K58E	S100ET		F88N				
H1.52	L1.66	S100ET				F88N				
H1	L1.68					F88A				
H1	L1.7					SS2E				
H1	L1.78					F88C				
H1	L1.71					F88K				
H1	L1.72					Y84P				
H1	L1.73					Y84L				
H1	L1.74					Y84W				
H1	L1.75					Y84V				
H1	L1.76					Y84A				
H1	L1.77					Y84R				
H1	L1.78					Y84Q				
H1	L1.79					Y84B				
H1	L1.8					SS2K				
H1	L1.80					Y84F				
H1	L1.81					Y84H				
H1	L1.82					Y84P				
H1	L1.83					Y84L				
H1	L1.84					Y84W				
H1	L1.85					Y84V				
H1	L1.86					Y84A				
H1	L1.87					Y84R				
H1	L1.88					Y84Q				
H1	L1.89					Y84T				
H1	L1.9					SS2L				
H1	L1.90					Y84K				
H1	L1.91					A88D				
H1	L1.92					A88L				
H1	L1.93					A88P				
H1	L1.94					A88H				
H1	L1.95					A88G				
H1	L1.96					A88M				
H1.191	L1.98	K58E	S100ET			A88N				
H1.192	L1.98	T57P	S100ET			A88N				
H1.193	L1.98	T57P	K58E	S100ET	R100RS	A88N				
H1.193	L1.98	T57P	K58E	S100ET		A88N				
H1	L1.97					A88Y				
H1	L1.98					A88K				
H1	L1.99					SS2T				
H3	L2.1					X27R				
H3	L2.10					S274H				
H3	L2.11					N2R3				
H3	L2.12					N2R4				
H3	L2.13					G39A				
H3	L2.14					G39B				

Figura 28 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Modelo	Cadeia pesada	Cadeia pesada				Cadeia leve				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5
H3	L2.15					N33D				
H3	L2.16					N33H				
H3	L2.17					T31A				
H3	L2.18					T31S				
H3	L2.19					Y32F				
H3	L2.2					K37G				
H3	L2.20					Y32H				
H3	L2.21					Y34F				
H3	L2.22					Y40F				
H3	L2.23					Y48H				
H3	L2.24					R50K				
H3	L2.25					R50O				
H3	L2.26					S32A				
H3	L2.27					S32N				
H3	L2.28					N33D				
H3	L2.29					N33S				
H3	L2.3					S27aA				
H3	L2.30					L54V				
H3	L2.31					A35G				
H3	L2.32					A35V				
H3	L2.33					S33A				
H3	L2.34					H31R				
H3	L2.35					N31Y				
H3	L2.36					L32I				
H3	L2.37					L32V				
H3	L2.38					E33D				
H3	L2.39					E33O				
H3	L2.4					S27aN				
H3	L2.40					Y34F				
H3	L2.41					Y34H				
H3	L2.42					F30L				
H3	L2.43					F30Y				
H3	L2.5					L27G				
H3	L2.6					L27G				
H3	L2.7					N27G				
H3	L2.8					N27G				
H3	L2.9					S27aA				

Figura 29

Variantes (numeração Kabay)

Modelo	Cadeia pesada	Cadeia pesada				Cadeia Leve					Mudança dentre as linhas
		1	2	3	4	1	2	3	4	5	
H1.139	L1	T57P									1,82
H1.143	L1	T57H									1,29
H1.144	L1	S109cT									2,26
H1.146	L1	S109H									2,43
H1.147	L1	S109S									2,66
H1.156	L1	T57P	S109cT	R109cS							3,42
H1.157	L1	S109cT									3,29
H1.159	L1	S109H									1,56
H1.162	L1	R109cS									1,65
H1.165	L1	R109cS									1,61
H1.176	L1	D56A									1,14
H1	L1.111					E58N					1,39
H1	L1.124					L58W					1,47
H1.182	L1.138	S109cT				S27eV	A58N				3,83
H1.188	L1.138	T57P	K58E	S109cT		S27eV	F58N				2,38
H1.182	L1.139	S109cT				S27eV	F58N				1,80
H1.182	L1.141	T57P	S109cT			A58N	F58N				2,57
H1.188	L1.141	T57P	K58E	S109cT		A58N	F58N				4,02
H1.182	L1.143	S109cT				L27cQ	A58N				3,83
H1.182	L1.144	T57P	S109cT			L27cQ	F58N				3,83
H1.182	L1.145	S109cT				L27cQ	F58N				2,81
H1.182	L1.146	T57P	S109cT			S27eV	A58N	F58N			3,19
H1.188	L1.146	T57P	S109cT	R109cS		S27eV	A58N	F58N			3,87
H1.189	L1.146	T57P	K58E	S109cT		S27eV	A58N	F58N			4,11
H1.182	L1.148	T57P	S109cT			L27cQ	A58N	F58N			4,63
H1.188	L1.148	T57P	K58E	S109cT		L27cQ	A58N	F58N			4,34
H1.184	L1.149	K58E	S109cT			L27cQ	A58N	F58N			6,62
H1.182	L1.149	S109cT				L27cQ	A58N	F58N			8,66
H1.182	L1.152	T57P	S109cT			L27cQ	S27eV	F58N			2,98
H1.182	L1.152	T57P	S109cT	R109cS		L27cQ	S27eV	F58N			4,38
H1.182	L1.152	T57P	K58E	S109cT		L27cQ	S27eV	F58N			3,55
H1.182	L1.154	T57P	S109cT			L27cQ	S27eV	A58N	F58N		5,12
H1.190	L1.154	T57P	S109cT	R109cS		L27cQ	S27eV	A58N	F58N		4,44
H1.191	L1.155	K58E	S109cT			L27cQ	S27eV	A58N	F58N		4,38
H1.204	L1.155	D58S	S109cT			L27cQ	S27eV	A58N	F58N		4,48
H1.203	L1.155	D58S	K58E	S109cT		L27cQ	S27eV	A58N	F58N		4,73
H1.152	L1.156	S109cT				L27cQ	S27eV	A58N	F58N		8,16
H1.181	L1.156	K58E	S109cT			L27cQ	S27eV	G29A	A58N	F58N	2,91
H1.201	L1.156	D58S	S109cT			L27cQ	S27eV	G29A	A58N	F58N	4,51
H1.202	L1.156	D58S	S109cT			L27cQ	S27eV	G29A	A58N	F58N	3,88
H1.203	L1.156	D58S	K58E	S109cT		L27cQ	S27eV	G29A	A58N	F58N	1,78
H1.204	L1.156	D58S	K58E	S109cT		L27cQ	S27eV	G29A	A58N	F58N	3,48
H1.152	L1.158	S109cT				L27cQ	S27eV	G29A	A58N	F58N	4,18
H1.181	L1.158	K58E	S109cT			L27cQ	S27eV	G29S	A58N	F58N	3,97
H1.201	L1.158	D58S	S109cT			L27cQ	S27eV	G29S	A58N	F58N	3,88
H1.202	L1.158	D58S	S109cT			L27cQ	S27eV	G29S	A58N	F58N	4,39
H1.203	L1.158	D58S	K58E	S109cT		L27cQ	S27eV	G29S	A58N	F58N	2,92

Figura 29 (continuação)

Variantes (numeração Kabat)

Número de变种	Modelo	Cadeia pesada					Cadeia leve					Mudança dobra de ligação
		1	2	3	4	1	2	3	4	5		
H1.204	L1.161	DSSF	K38E	S100cT		L27cQ	S27eV	G29S	ASSN	F98I	3.27	
H1.52	L1.161	S100cT				L27cQ	S27eV	G29S	ASSN	F98I	3.18	
H1.191	L1.162	K38E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	ASSN	F98I	3.35	
H1.201	L1.162	DSSF	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	ASSN	F98I	3.57	
H1.202	L1.162	DSSF	S100cT			L27cQ	S27eA	G29A	ASSN	F98I	4.32	
H1.203	L1.162	DSSF	K38E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29A	ASSN	F98I	3.25	
H1.204	L1.162	DSSF	K38E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29A	ASSN	F98I	4.57	
H1.52	L1.162	S100cT				L27cQ	S27eA	G29A	ASSN	F98I	5.57	
H1.191	L1.163	K38E	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	ASSN	F98I	5.32	
H1.201	L1.163	DSSF	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	ASSN	F98I	3.87	
H1.202	L1.163	DSSF	S100cT			L27cQ	S27eA	G29S	ASSN	F98I	3.57	
H1.203	L1.163	DSSF	K38E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29S	ASSN	F98I	3.20	
H1.204	L1.163	DSSF	K38E	S100cT		L27cQ	S27eA	G29S	ASSN	F98I	4.73	
H1.52	L1.163	S100cT				L27cQ	S27eA	G29S	ASSN	F98I	3.74	
H1.201	L1.164	DSSF	S100cT			L27cQ	S27eA	ASSN	F98I		4.41	
H1.203	L1.164	DSSF	K38E	S100cT		L27cQ	S27eA	ASSN	F98I		5.58	
H1	L1.17					E80T					1.57	
H1	L1.18					E83Y					1.78	
H1	L1.20					L27cQ					1.73	
H1	L1.23					S22Q					1.85	
H1	L1.22					S27eV					2.61	
H1	L1.46					N93H					1.75	
H1	L1.54					N93G					1.50	
H1	L1.55					N93Y					1.58	
H1	L1.84					F98I					1.80	
H1	L1.87					F95V					1.73	
H1	L1.98					F95W					2.12	
H1	L1.8					S22K					2.18	
H1	L1.80					Y34F					1.62	
H1	L1.9					S22L					1.84	
H1	L1.92					ASSN					1.54	
H1	L1.96					ASSN					1.58	

Figura 3a
Proliferação de células B purificadas e concentração variável de anti-mu após 3 dias

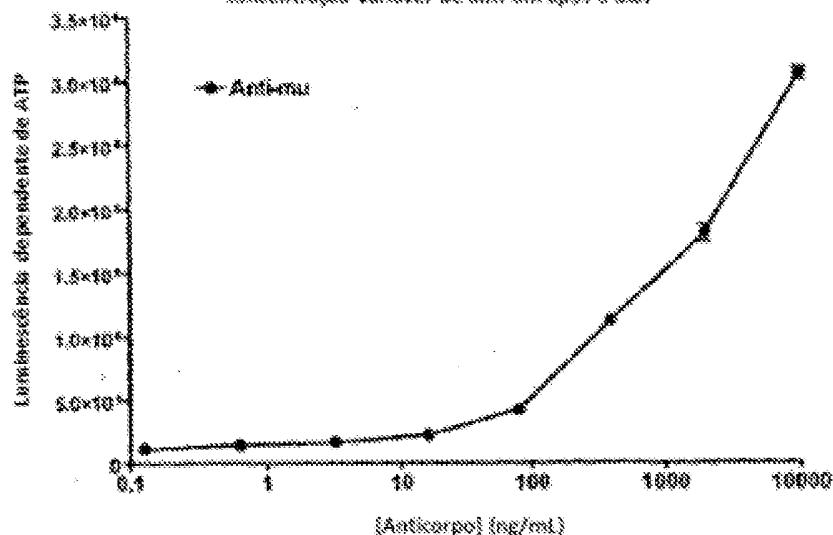


Figura 3b
Viability de células B purificadas após 3 dias na presença de anticorpos anti-CD19 com quantidade fixa (2 mg/ml) de anti-mu como coestimulador

