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

(21) BR 112019025328-9 A2

(22) Data do Depósito: 07/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO TENDO UM CÂNCER E PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, KIT DE PARTES.

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C07K 16/30; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 07/06/2017 US 62/516489; 08/01/2018 US 62/614801.

(71) Depositante(es): GENMAB B.V..

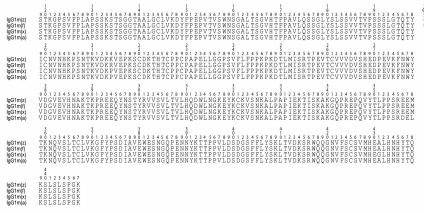
(72) Inventor(es): METTE HAMBORG JENSEN; LENE SCHANTZ HARLOW; ANDREW HAGARMAN; CALE HALBLEIB.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018065071 de 07/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/224609 de 13/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 29/11/2019

(57) Resumo: A presente invenção se refere à formulação de anticorpos. A invenção se refere em particular às composições farmacêuticas compreendendo uma molécula de anticorpo do isótipo IgG1 tendo uma mutação na região Fc que realça o agrupamento de moléculas de IgG depois da ligação a antígeno na superfície celular.



COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO TENDO UM CÂNCER E PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, KIT DE PARTES

Campo da invenção

[001] A presente invenção se refere às composições farmacêuticas compreendendo anticorpos de um isótipo IgG tendo uma mutação na região Fc que realça a hexamerização de anticorpos IgG depois da ligação de antígeno de superfície celular. A invenção também se refere a métodos para preparar composições farmacêuticas da invenção e aos usos de tais composições.

Fundamentos da invenção

[002] Os anticorpos IgG podem se organizar em hexâmeros ordenados nas superfícies celulares depois da ligação de seu antígeno alvo. Estes hexâmeros se ligam ao primeiro componente de complemento C1 induzindo à matança da célula alvo dependente de complemento. Mutações foram identificadas que realçam a formação de hexâmero e ativação de complemento pelos anticorpos IgG contra uma faixa de alvos nas células a partir de indicações hematológicas e de tumor sólido (de Jong *et al*. 2016 PLoS Biol 14(1): e1002344, WO2013/004842, WO2014/108198). As espinhas dorsais de IgG por exemplo IgG1 tendo mutações nas posições específicas na região Fc transportaram uma forte capacidade para induzir citotoxicidade dependente de complemento (CDC) condicional de linhagens de célula e células tumorais de paciente com leucemia linfocítica crônica (CLL), enquanto retiveram capacidade de desenvolvimento farmacocinética e biofarmacêutica regular. As mutações potentemente realçaram a citotoxicidade celular dependente de CDC e anticorpo (ADCC) de um anticorpo CD20 tipo II que foi ineficaz na ativação de complemento, enquanto retém a sua capacidade para induzir apoptose (de Jong, *supra*).

[003] DR5, também conhecido como receptor da morte 5, Membro 10B da superfamília de receptor do fator de necrose de tumor, TNFRSF10B, receptor 2 do ligante indutor da apoptose relacionada com TNF, receptor 2 de TRAIL, TRAIL-R2 e CD262, é um receptor de superfície celular da superfamília do receptor de TNF que liga o ligante indutor de apoptose relacionada com o fator de necrose de tumor (TRAIL) e medeia a apoptose. DR5 é uma proteína de membrana tipo I de passagem única com três domínios ricos em cisteína extracelular (CRDs), um domínio de transmembrana (TM) e um domínio citoplásmico contendo um domínio da morte (DD). Na ausência de ligante, DR5 existe na membrana celular como monômero ou como complexos pré-montados de dois ou três receptores através de interações do primeiro domínio rico em cisteína, também conhecido como domínio de montagem pré-ligante (PLAD) (Wassenaar *et al*., Proteins. 1 de fev de 2008; 70(2): 333-43; Valley *et al*., J Biol Chem. 15 de jun de 2012; 287(25): 21265-78; Sessler *et al*., Pharmacol Ther. nov de 2013; 140(2): 186-99). Uma estrutura cristalina de TRAIL em complexo com o ectodomínio DR5 mostrou que TRAIL se liga à CRD2 e CRD3 no domínio extracelular de DR5 em um complexo contendo um receptor trimérico e um ligante trimérico (Hymowitz *et al*., Mol Cell. out de 1999; 4(4): 563-71). Os trímeros de DR5 podem agrupar adicionalmente em agregados receptores de ordem superior em macrodomínios lipídicos, as chamadas jangadas lipídicas (Sessler *et al*., Pharmacol Ther. nov de 2013; 140(2): 186-99). na conformação ligada a ligante, a proteína adaptadora contendo domínio da morte citoplásmica FADD associa-se com a superfície DD intracelular das moléculas DR5 oligomerizadas e engatam as caspases iniciadoras caspase-8 e caspase-10 para formar o complexo sinalizador indutor de morte (DISC).

[004] Com base na sensibilidade das células cancerosas à apoptose mediada por TRAIL, numerosos agentes foram desenvolvidos para ativar este caminho para induzir apoptose seletivamente nas células cancerosas. TRAIL

recombinante humano (hrTRAIL), está sendo desenvolvido como dulanermina e uma série de anticorpos anti-DR5 convencionais (monoespecíficas, bivalente) foi desenvolvida e testada na clínica (revisado em Ashkenazi *et al*., Nat Rev Drug Discov. dez de 2008; 7(12): 1001-12; Trivedi *et al*., Front Oncol. 2 de abril de 2015; 5: 69): os anticorpos DR5 incluem lexatumumab (HGS-ETR2), HGS-TR2J, conatumumab (AMG655), tigatuzumab (CS-1008), drozitumab (Apomab) e LBY-135. Estudos clínicos com estes compostos demonstraram que os anticorpos DR5 foram geralmente bem tolerados, mas falharam em mostrar benefícios clínicos convincentes e significantes. Esforços para realçar a eficácia dos anticorpos alvejadores de DR5 principalmente focalizam na (i) melhora da sensibilidade das células cancerosas aos agonistas de DR5 através do tratamento de combinação, (ii) desenvolvimento de biomarcadores para melhor estratificação de paciente e (iii) no desenvolvimento de agentes alvejadores de DR5 que ativam a sinalização de DR5 e a indução da apoptose mais eficazmente (revisado em Lim *et al*., Expert Opin Ther Targets. 25 de maio de 2015: 1-15; Twomey *et al*., Drug Resist Updat. mar de 2015; 19: 13-21; Reddy *et al*., PLoS A. 17 de set de 2015; 10(9)). Formatos terapêuticos diferentes para aumentar a ativação de DR5 foram descritos e incluem a oligomerização de peptídeos de ligação de DR5 sintético, fusões lineares de armações específicas de DR5, sistemas de entrega com base em nanopartícula de rhTRAIL ou conatumumab e formatos com base em anticorpo DR5 multivalente (revisado em Holland *et al*., Cytokine Growth Factor Rev. Abr de 2014; 25(2): 185-93). APG880 e derivados existem de duas moléculas de ligação do receptor TRAIL de cadeia única (scTRAIL-RBD) (imitações de TRAIL) fundido à parte Fc de uma IgG humana. Cada scTRAIL-RBD tem três sítios de ligação de receptor resultantes em um modo de ligação hexavalente na proteína de fusão (WO 2010/003766 A2). Um protótipo scTRAIL-RBD (APG350) foi descrito para induzir eficácia antitumor independente de FcγR *in vivo* (Gieffers *et al*., Mol

Cancer Ther, 2013. 12(12): p. 2735-47). Um construto derivado de fragmento de anticorpo anti-DR5 tetravalente, montado pela fusão de um fragmento scFv anti-DR5, resíduos de albumina sérica humana e o domínio de tetramerização de p53 humano, foi mostrado induzir apoptose mais potentemente do que o construto monovalente (Liu *et al*., Biomed Pharmacother. mar de 2015; 70: 41-5). As moléculas de nanocorpo são fragmentos de anticorpo de domínio único (VHH) derivados da anticorpos camelídeos apenas com cadeia pesada, que, similarmente aos scFvs, podem ser ligados para formar moléculas multivalentes. Estudos pré-clínicos *in vitro* mostraram que TAS266, uma molécula de Nanocorpo® anti-DR5 tetravalente, foi mais potente do que TRAIL ou anticorpo DR5 reticulado LBY-135, que foi atribuído às cinéticas de ativação de caspase mais rápidas (Huet *et al*., MAbs. 2014; 6(6): 1560-70). TAS266 foi também mais potente *in vivo* do que o mAb de murino parental de LBY-135. As moléculas MultYcorpo® (MultYmab technology) são fundamentadas na fusão de um peptídeo homomultimerizante ao Fc de uma cadeia pesada em um heterodímero de IgG (*knob into hole*), tornando as moléculas MultYcorpo intrinsecamente multivalentes em solução. Um MultYcorpo anti-DR5 foi mostrado induzir matança potente *in vitro*. As moléculas de realvejamento de afinidade dual (DART) são diacorpos com base em Fv covalentemente ligados. DARTs Fc tetravalentes alvejando DR5 compreendendo tetravalência para um único epítopo DR5 (DARTs monoepitópicos) ou dois (DARTs biepitópicos) foram mostrados ser mais potentes do que TRAIL e uma variante conatumumab na indução na citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (Li *et al*., AACR Annual Meeting 20 de abr de 2015, Poster Abstrato #2464). Alternativamente, o hiperagrupamento de DR5 dirigido pela avidez independente de FcγR pode ser mediado por um anticorpo DR5xFAP biespecífico (RG7386) através da ligação simultânea ao DR5 na célula cancerosa e à proteína de ativação de fibroblasto (FAP) que é expressa nos fibroblastos no microambiente de tumor

(Friess *et al*., AACR Annual Meeting 19 de abr de 2015, Presentation Abstrato #952; Wartha *et al*., Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 5 a 9 de abr de 2014; San Diego, CA. Filadélfia (PA): AACR; Cancer Res 2014; 74(Supl 19): Abstrato nr 4573. doi: 10,1158/1538-7445.AM2014-4573). Finalmente, combinações específicas de dois anticorpos anti-DR5 reconhecendo epítopos diferentes têm mostrado eficácia agonística realçada *in vitro* e *in vivo* comparadas com combinações de dois anticorpos anti-DR5 reconhecendo epítopos sobrepostos ou similares (WO2014/009358).

[005] As abordagens descritas acima mostram eficácia realçada comparada com anticorpos anti-DR5 convencionais em estudos pré-clínicos, entretanto os dados clínicos indicam que existe ainda uma necessidade quanto à melhora dos agonistas de DR5. Além disso, é desejável para os formatos com base em anticorpo para preservar uma farmacocinética (PK) assim como outras funções efetoras mediadas por Fc de IgG regular, que usualmente não é o caso com construtos com base em fragmento de anticorpo.

[006] A PCT/EP2016/079518, aqui incorporada por referência, provê anticorpos anti-DR5 compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno a se ligar ao DR5, em que a região Fc compreende uma mutação em uma posição de aminoácido correspondendo às posições E430, E345 ou S440. Foi verificado que a introdução de uma mutação pontual específica na região Fc de um anticorpo anti-DR5 que facilita a hexamerização do anticorpo na ligação de antígeno de superfície celular e agrupamento condicional do antígeno independente na reticulação secundária, resulta na ativação de DR5 e significantemente realça a potência do anticorpo na indução da apoptose e morte celular.

[007] Existe uma necessidade quanto à provisão de formulações estáveis para os anticorpos descritos na PCT/EP2016/079518 e mais geralmente quanto aos anticorpos que hexamerizem mais facilmente devido a

uma mutação em uma posição de aminoácido correspondendo à posição E430, E345 ou S440 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 seja S440Y ou S440W.

Sumário da invenção

[008] Surpreendentemente, os inventores da presente invenção verificaram composições que proveem uma formulação estável para anticorpos variantes que hexamerizam mais facilmente devido a uma mutação em uma posição de aminoácido correspondendo à posição E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, com a condição de que a mutação em S440 seja S440Y ou S440W. Dois de tais anticorpos com sequências totalmente diferentes nos seus domínios CDR foram ambos verificados ser estáveis na composição da invenção.

[009] Em um primeiro aspecto principal, a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo:

a. um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU,

b. um tampão de histidina, e

c. cloreto de sódio

em que o pH da composição está entre 5,5 e 7,4.

[0010] Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a S440 na IgG1 humana, na numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 seja S440Y ou S440W.

[0011] Tais formulações foram verificadas prover excelente solubilidade e estabilidade de anticorpo sob condições de estresse, tais como aquecimento, ciclos de congelamento-descongelamento e agitação. A formação mínima de agregados macromoleculares ou outras impurezas tais

como produtos de degradação foi observada.

[0012] Em aspectos adicionais, a invenção se refere à composição farmacêutica da invenção para o uso como um medicamento, ao uso de uma composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento e aos métodos de tratar indivíduos compreendendo administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica da invenção.

[0013] Ainda em aspectos adicionais, a invenção se refere a kits compreendendo duas ou mais composições farmacêuticas da invenção e aos métodos para preparar uma composição farmacêutica da invenção compreendendo a etapa de misturar duas composições farmacêuticas da invenção cada uma compreendendo anticorpos diferentes.

[0014] Em uma modalidade preferida da composição farmacêutica da invenção, o anticorpo compreende uma região de ligação de antígeno que se liga ao DR5 humano, preferivelmente em que a região de ligação a antígeno compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

b) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

c) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14;

d) (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ ID NOs: 21, GAS, 22 ou

e) a (VH) CDR1, CDR2, CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em qualquer um de a) a d) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR.

[0015] Tais anticorpos ligando ao DR5 e compreendendo uma

mutação realçadora de hexamerização na região Fc correspondendo à posição E430, E345 ou S440 da IgG1 humana (de acordo com a numeração EU), com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440 W, foram verificadas serem superiores na indução da apoptose nas células de tumor expressando DR5 comparado aos anticorpos que ligam DR5 sem uma mutação em uma das posições mencionadas acima.

[0016] Em uma modalidade preferida adicional, a composição farmacêutica da invenção compreende pelo menos dois anticorpos, compreendendo um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo, em que

• o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR: (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR, (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, ou

• o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR: (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[0017] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção compreende pelo menos dois anticorpos, compreendendo um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR: (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR, (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[0018] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção compreende pelo menos dois anticorpos, compreendendo um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR: (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as

seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[0019] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção compreende um primeiro anticorpo, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR: (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6.

[0020] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção compreende um segundo anticorpo, em que o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[0021] Tais composições compreendendo dois anticorpos anti-DR5, que ligam epítopos diferentes no DR5, foram verificadas ser superiores em estudos *in vitro* e *in vivo* às composições compreendendo os mesmos anticorpos anti-DR5 sem a mutação. Isto é, as composições com dois anticorpos da presente invenção foram superiores na indução da apoptose e/ou inibição do crescimento celular de células de tumor expressando DR5 comparadas com as composições compreendendo dois anticorpos DR5 sem uma mutação na região Fc.

Breve descrição dos desenhos

[0022] A Figura 1 mostra um alinhamento de aminoácidos dos quatro alotipos de IgG1 Fc humana diferentes. A sequência de Fc da IgG1m(f), IgG1m(z), IgG1m(a), IgG1m(x) é especificada na SEQ ID: 29, 30, 31 e 32 respectivamente.

[0023] A Figura 2 mostra a ligação de anticorpos anti-DR5 humanizados (hDR5) e quiméricos (DR5) às células de câncer colônico humano HCT 116 positivas em DR5 como medida pela citometria de fluxo no FACS. O anticorpo Anti-gp120 IgG1-b12 foi usado como um controle negativo. A ligação é expressa como MFI (intensidade de fluorescência média). As barras de erro indicam o desvio padrão.

[0024] A Figura 3 mostra a ligação de anticorpos anti-DR5 com e sem mutações realçadoras de hexamerização E430G ou E345K às células COLO 205 positivas em DR5. As variantes dos anticorpos quiméricos de ser humano-camundongo IgG1-DR5-01-K409R (A), IgG1-DR5-05-F405L (B) e anticorpo biespecífico IgG1-DR5-01-K409R x IgG1-DR5-05-F405L (BsAb IgG1-DR5-01-K409R x DR5-05-F405L) (C) foram testados pela análise citométrica de fluxo no FACS quanto à ligação às células COLO 205. A ligação é expressa como média geométrica de intensidade de fluorescência. O anticorpo anti-gp120 IgG1-b12 foi usado como controle negativo. As barras de erro indicam o desvio padrão.

[0025] A Figura 4 mostra a ligação de anticorpos anti-DR5 ao DR5 de ser humano e macaco rhesus. Anticorpos quiméricos de ser humano-camundongo IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G foram testados na análise citométrica de fluxo no FACS quanto à ligação às (A) células CHO transfectadas em modo simulado, (B) Células CHO transfectadas em DR5 humano e (C) Células CHO transfectadas em DR5 de macaco rhesus. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência. As barras de erro indicam o desvio padrão.

[0026] A Figura 5 mostra (A) Alinhamento de sequência de parte dos domínios extracelulares de DR5 humano e DR5 de camundongo usando EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/); (.)aminoácido similar; (:)aminoácido idêntico. (B) Representação gráfica do domínio extracelular de DR5 trocado em domínio (branco: sequências de DR5 de ser humano; preto: sequências de DR5 de camundongo). Os números de aminoácido referem-se à sequência humana e trocas de domínio foram feitas com base no alinhamento mostrado no painel A. (C) Ligação de IgG1-hDR5-01-F405L e o anticorpo de controle de isótipo IgG1-b12 a um painel de moléculas de DR5 quiméricas de ser humano-camundongo, como avaliado pela citometria de fluxo. Em cada molécula de DR5 trocada em domínio,

aminoácidos humanos específicos foram substituídos pela sequência de camundongo, como indicado no eixo dos x. As barras de erro indicam o desvio padrão de amostras duplicadas. (D) Ligação de IgG1-hDR5-05-F405L a um painel de moléculas de DR5 quiméricas de ser humano-camundongo, como avaliado pela citometria de fluxo. Em cada molécula de DR5 trocada em domínio, aminoácidos humanos específicos foram substituídos pela sequência de camundongo, como indicado no eixo x. IgG1-b12 foi incluído em um anticorpo de controle de isótipo. As barras de erro indicam o desvio padrão de amostras em duplicata.

[0027] A Figura 6 mostra ELISA de bloqueio cruzado com anticorpos DR5-01 e DR5-05. Os gráficos representam a inibição da ligação de IgG1-hDR5-01-E430G (A) ou IgG1-hDR5-05-E430G (B) revestidos ao DR5ECD-FcHisCtag solúvel na presença de anticorpo competidor IgG1-hDR5-01-E430G ou IgG1-hDR5-05-E430G como medido pelo ELISA. O anticorpo anti-gp120 IgG1-b12 (b12) foi usado como controle negativo. DR5-01 é IgG1-hDR5-01-E430G; DR5-05 é IgG1-hDR5-05-E430G.

[0028] A Figura 7 mostra um ensaio de viabilidade com variantes de anticorpos DR5-01 e DR5-05. A introdução da mutação realçadora de hexamerização de E430G resulta na indução realçada do extermínio de COLO 205 positivo em DR5 (A) e HCT 116 (B) células de câncer do cólon pelos anticorpos quiméricos únicos de ser humano-camundongo IgG1-DR5-01-K409R e IgG1-DR5-05-F405L usados sozinhos e pela combinação dos mesmos. As barras de erro indicam desvio padrão.

[0029] A Figura 8 mostra (A) ELISA de bloqueio cruzado entre IgG1-chTRA8-F405L e IgG1-DR5-01-K409R ou IgG1-DR5-05-F405L, respectivamente. A combinação dos dois anticorpos anti-DR5 não bloqueando cruzado IgG1-chTRA8-F405L-E430G e IgG1-DR5-01-K409R-E430G (B) resultou na indução realçada do extermínio de células cancerosas colônicas HCT 116 (EC50 diminuído), ao passo que combinando os dois anticorpos

bloqueando cruzado IgG1-chTRA8-F405L-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G (C) não, como determinado em um ensaio de viabilidade de 3 dias. As barras de erro indicam desvio padrão.

[0030] A Figura 9 mostra que a introdução de uma mutação realçadora da hexamerização resulta na indução realçada de matança de células cancerosas colônicas HCT 116 pela combinação de anticorpos *não* bloqueando cruzado IgG1-DR5-05-F405L-E345K + IgG1-CONA-K409R-E430G e BsAb IgG1-DR5-05-F405L-E345K x CONA-K409R-E430G. (A) ELISA de bloqueio cruzado com IgG1-CONA-K409R e IgG1-DR5-05-F405L. (B) ensaio de viabilidade de 3 dias. As barras de erro indicam desvio padrão. RLU: Unidades de Luminescência Relativa.

[0031] A Figura 10 mostra que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G reduz a viabilidade de um painel grande de linhagens de célula cancerosa humana diferentes, como determinado em um ensaio de viabilidade de 3 dias. Os gráficos mostram a média +/- desvio padrão de amostras em duplicata. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ (ANOVA de uma via com teste de comparações múltiplas de Tukey).

[0032] A Figura 11 mostra a potência da combinação dos anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G e da combinação de anticorpos quiméricos IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G como medido em um ensaio de viabilidade nas linhagens de célula de câncer pancreático BxPC-3 e PANC-1. Os gráficos representam valores médios de amostras em duplicata (BxPC-3) ou triplicata (PANC-1) +/- desvio padrão.

[0033] A Figura 12 mostra (A) análise citométrica de fluxo usando a análise FACS para estudar o efeito de imitar a desamidação em anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R e IgG1-hDR5-05-F405L na ligação às células de câncer de cólon humanas HCT 116. A introdução da mutação

N55D que imita a desamidação de Asn resultou na ligação diminuída de IgG1-hDR5-01-K409R, mas teve efeito mínimo sobre a ligação de IgG1-hDR5-05-F405L. (B) Análise de citometria de fluxo para estudar o efeito de impedir a desamidação no anticorpo DR5-01 humanizado na ligação às células de câncer de cólon humanas HCT 116. A introdução da substituição de aminoácido G56T em IgG1-hDR5-01-E430G não teve nenhum efeito sobre a ligação do anticorpo às células HCT 116. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência. (C) Potência da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G como medido em um ensaio de viabilidade nas células de câncer pancreático BxPC-3. Os gráficos representam valores médios de amostras em duplicata +/- desvio padrão.

[0034] A Figura 13 mostra o ensaio de viabilidade com variantes de repulsa e complementaridade de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G. A introdução da mesma mutação de repulsa (K439E ou S440K) em ambos os anticorpos resulta na indução diminuída de matança de células cancerosas pancreáticas BxPC-3 (A) e colônicas HCT-15 (B). Combinando-se as duas mutações (K439E e S440K) em ambos anticorpos, a repulsão é neutralizada e o extermínio restaurado. As barras de erro indicam desvio padrão.

[0035] Figura 14: Envolvimento de interações Fc na capacidade de combinação do anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G com mutação realçadora de hexamerização para induzir agrupamento de receptor na superfície da célula e indução de apoptose. A indução de apoptose é inibida pelo peptídeo de ligação de Fc DCAWHLGELVWCT como mostrado em um ensaio de viabilidade de 3 dias nas células cancerosas humanas BxPC-3.

[0036] A Figura 15 mostra a eficácia de razões diferentes de combinações de IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G

(DR5-01:DR5-05) nas células cancerosas humanas BxPC-3 aderentes como determinada em um ensaio de viabilidade de 3 dias.

[0037] A Figura 16 mostra a eficácia de razões diferentes de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G (DR5-01: DR5-05) nas células cancerosas humanas BxPC-3 (A) e HCT-15 (B) aderentes como determinado em um ensaio de viabilidade de 3 dias.

[0038] A Figura 17 mostra a morte celular programada dependente de Caspase pela combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G humanizados como medida em um ensaio de viabilidade nas células de câncer pancreático PANC-1 (A e B) e BxPC-3 (C). 01-E430G é IgG1-hDR5-01-E430G; 05-E430G é IgG1-hDR5-05-E430G; ZVAD é inibidor da pan-caspase Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK).

[0039] A Figura 18 mostra a indução da morte celular na ligação de anticorpo anti-DR5 ou combinações de anticorpo anti-DR5 nas Células de câncer de cólon COLO 205. As células COLO 205 foram incubadas com amostra de anticorpo durante 5 horas (A-C) e 24 horas (D-E). Estágios diferentes de indução da morte celular foram analisados pelo tingimento duplo V/PI de Anexina e tingimento da caspase-3 ativa. Os painéis C e D mostram o tingimento duplo V/PI da Anexina em 5 e 24 horas respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão de 2 amostras em duplicata. 01 é IgG1-DR5-01-K409R, 05 é IgG1-DR5-05-F405L, 01-E430G é IgG1-DR5-01-K409R-E430G, 05-E430G é IgG1-DR5-05-F405L-E430G.

[0040] A Figura 19 mostra as cinéticas da ativação da Caspase-3/7 na ligação de anticorpos DR5 nas células de câncer de cólon COLO 205. As células COLO 205 foram incubadas com anticorpo durante 1, 2, 5 e 24 horas. A ativação da Caspase-3/7 foi analisada em um ensaio de luminescência homogênea. AU, unidades arbitrárias. As barras de erro indicam o desvio padrão de amostras em duplicata.

[0041] A Figura 20 mostra a eficácia da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G na presença ou ausência de reticulação Fc pelos fragmentos F(ab')$_2$ de um anticorpo IgG anti-humano e comparação com os anticorpos anti-DR5 IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-chTRA8-F405L em um ensaio de viabilidade de 3 dias nas células de câncer de cólon COLO 205 e de câncer pancreático BxPC-3 e PANC-1 aderentes. O anticorpo de ligação não alvo IgG1-b12 foi incluído como um controle negativo. Os gráficos mostram a média +/- desvio padrão de amostras em duplicata. * p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

[0042] A Figura 21 mostra a potência da combinação dos anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G e da combinação de anticorpos humanizados IgG1-DR5-01-E430G + IgG1-DR5-05-E430G como medida em um ensaio de viabilidade nas células de câncer pancreático BxPC-3. Os gráficos representam valores médios de amostras em duplicata +/- desvio padrão.

[0043] A Figura 22 mostra a potência dos anticorpos BsAb quiméricos IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G sobre as linhagens de célula cancerosa humana diferentes determinada em um ensaio de viabilidade de 3 dias sobre células aderentes das linhagens de célula de câncer de cólon COLO 205, pancreático BxPC-3, gástrico SNU-5, pulmonar SK-MES-1 e de pele A375. Os gráficos mostram a média +/- desvio padrão de amostras em duplicata. * p<0,05, *** p<0,001, **** p<0,0001 (ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas). (01x05)-E430G é BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G.

[0044] A Figura 23 mostra a eficácia de BsAb quimérico IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G na presença ou ausência de reticulação de Fc pelos fragmentos F(ab')$_2$ de um anticorpo IgG anti-humano

em comparação com os anticorpos anti-DR5 IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-chTRA8-F405L em um ensaio de viabilidade de 3 dias nas células de câncer pancreático BxPC-3 e de câncer de cólon COLO 205 aderentes. O anticorpo de ligação não alvo IgG1-b12 foi incluído como um controle negativo. Os gráficos mostram a média +/- desvio padrão de amostras em duplicata. * p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas). (01x05)-E430G é BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x IgG1-DR5-05-F405L-E430G

[0045] A Figura 24 mostra a indução da morte celular na ligação de anticorpos DR5 biespecíficos nas células de câncer de cólon COLO 205. As células COLO 205 foram incubadas com 1 µg/mL de anticorpo durante 5 horas (A-C) e 24 horas (D-E). Estágios diferentes de indução da morte celular foram analisados pelo tingimento duplo V/PI de Anexina e tingimento de caspase-3 ativa. As barras de erro indicam o desvio padrão de 2 amostras em duplicata. 01 é IgG1-DR5-01-K409R, 05 é IgG1-DR5-05-F405L, 01-E430G é IgG1-DR5-01-K409R-E430G, 05-E430G é IgG1-DR5-05-F405L-E430G, 01x05 é BsAb IgG1-DR5-01-K409R x DR5-05-F405L, 01-E430G x 05-E430G é BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G.

[0046] A Figura 25 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* da combinação dos anticorpos quiméricos IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer de cólon COLO 205 humanas. O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos indicados (5 mg/kg) é mostrado em tempo (A) e no dia 23 (B). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 750 mm^3 é mostrada em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0047] A Figura 26 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* de doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação para IgG1-CONA em um xenoenxerto

subcutâneo de câncer de cólon COLO 205. O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com a dose de anticorpo indicada é mostrado em tempo (A) e no dia 16 (B). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 500 mm^3 é mostrado em uma plotagem de Kaplan-Meier. * p<0,05 , *** p<0,001.

[0048] A Figura 27 mostra a avaliação da eficácia in vivo de diferentes doses da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação com IgG1-CONA-F405L em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer pancreático humano BxPC-3. O tamanho do tumor nos camundongos tratados com os anticorpos indicados é mostrado em tempo (A, tamanho do tumor mediano) e no dia 48 depois da inoculação de tumor (B, média do tamanho do tumor & SEM). * p<0,05, ** p<0,01 (Teste t não emparelhado). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 500 mm^3 é mostrado em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0049] A Figura 28 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* de doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação com IgG1-CONA-F405L em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com Células de câncer de pele humano A375. O tamanho do tumor em camundongos tratados com os anticorpos indicados é mostrado em tempo (A, tamanho do tumor mediano) e no dia 29 depois da inoculação do tumor (B, média do tamanho do tumor & SEM). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (teste de Mann Whitney).

[0050] A Figura 29 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* de doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação para IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células HCT-15 de câncer de cólon humano. O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos indicados é mostrado em tempo (A) e no dia 17 depois do início do

tratamento (B). **** p<0,001 (teste t não emparelhado). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 500 mm^3 é mostrado em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0051] A Figura 30 mostra a avaliação da eficácia in vivo de doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação com IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer de cólon humano SW480. O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos indicados é mostrado em tempo (A) e no dia 28 depois do início do tratamento (B). * p<0,05, ** p<0,01 (Teste t não emparelhado). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 500 mm^3 é mostrado em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0052] A Figura 31 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* de doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação com IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer gástrico humano SNU-5. O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos indicados é mostrado em tempo (A) e no dia 23 depois do início do tratamento (B). ** p<0,01, *** p<0,001 (teste de Mann Whitney). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 500 mm^3 é mostrado em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0053] A Figura 32 mostra a avaliação da eficácia in vivo de doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e comparação com IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer pulmonar humano SK-MES-1. O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos indicados é mostrado em tempo (A) e no dia 14 depois do início do tratamento (B). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 1.000 mm^3 é mostrado em uma plotagem de Kaplan-

Meier.

[0054] A Figura 33 mostra a ligação das células de câncer de cólon humano HCT 116 positivo em DR5 pelos anticorpos anti-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 com e sem a mutação E430G como medida pela citometria de fluxo. O anticorpo anti-gp120 IgG1-b12 foi usado como um controle negativo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (FI). As barras de erro indicam o desvio padrão. Um exemplo representativo de sete experimentos é mostrado.

[0055] A Figura 34 mostra a ligação às células de câncer de cólon humano HCT 116 positivo em DR5 pelos anticorpos anti-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G como medido pela citometria de fluxo com anticorpos diretamente rotulados. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (FI) de Alexa 647. As barras de erro indicam o desvio padrão.

[0056] A Figura 35 mostra a ligação de anticorpos anti-DR5 ao DR5 de ser humano e de macaco cinomolgo. Os anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G foram testados pela citometria de fluxo quanto à ligação às (A) células CHO transfectadas em DR5 humano e (B) células CHO transfectadas em DR5 cinomolgo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (FI). As barras de erro indicam o desvio padrão.

[0057] A Figura 36 mostra um ensaio de viabilidade de 3 dias para mostrar o efeito de introduzir a mutação E430G nos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 não bloqueando cruzado nas células de câncer de cólon COLO 205. As barras de erro indicam desvio padrão. Um exemplo representativo de quatro experimentos é mostrado.

[0058] A Figura 37 mostra um ensaio de viabilidade com anticorpos DR5 nas células de câncer de cólon humano COLO 205. A introdução da mutação realçadora de hexamerização S440Y resultou na indução de matança

pelos anticorpos isolados IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 (A) e eficácia aumentada da combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 (B). As barras de erro indicam desvio padrão.

[0059] A Figura 38 mostra a eficácia de anticorpos IgG1-DR5-CONA-E430G + IgG1-DR5-chTRA8-E430G não bloqueando cruzado para induzir o extermínio de células de câncer pancreático humano BxPC-3. (A) ELISA de bloqueio cruzado entre IgG1-DR5-CONA-K409R (CONA) e IgG1-DR5-chTRA8-F405L (chTRA8). (B) A introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G resultou na indução realçada do extermínio de células BxPC-3 pela combinação de IgG1-DR5-CONA-C49W-E430G + IgG1-DR5-chTRA8-E430G como determinado em um ensaio de viabilidade de 3 dias. As barras de erro indicam desvio padrão.

[0060] A Figura 39 mostra ensaios de viabilidade de 3 dias com 133 nM de TRAIL humano recombinante ou 133 nM das combinações de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (E430G) e IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 (WT) nas linhagens de célula cancerosa humana diferentes. Os gráficos mostram a média +/- desvio padrão de amostras em duplicata. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ (ANOVA de uma via com teste das comparações de múltiplas de Tukey).

[0061] A Figura 40 mostra a inibição percentual pelo (A) anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+ IgG1-hDR5-05-E430G) e (B) terapia TRAIL como determinada em um ensaio de viabilidade de 3 dias triando de um painel de linhagem de célula na Horizon, UK. Cada ponto de dados representa uma linhagem de célula individual da indicação de câncer humano indicada. As linhas pontilhadas indicam o valor de limiar de resposta máxima a 70% que foi ajustado para categorizar as linhagens de célula como respondedoras ($\geq$ 70% de inibição) e não respondedoras ($<$ 70% de inibição).

[0062] A Figura 41 mostra a eficácia de razões de anticorpo diferentes na combinação IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G

(indicado como 01-E430G: 05-E430G) nas células de câncer humano aderentes (A) BxPC-3 pancreático e (B) HCT-15 de cólon como determinada em um ensaio de viabilidade de 3 dias. Os exemplos representativos de dois e três experimentos são mostrados para HCT-15 e BxPC-3, respectivamente.

[0063] A Figura 42 mostra a morte celular programada dependente da Caspase pela combinação dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, a combinação WT parental sem a mutação E430G e TRAIL como medido em um ensaio de viabilidade nas células de câncer pancreático BxPC-3. ZVAD é o inibidor de pan-caspase Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK).

[0064] A Figura 43 mostra as cinéticas da ativação de Caspase-3/7 na ligação da combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G nas células de câncer pancreático BxPC-3, comparadas com a combinação WT parental sem a mutação E430G e TRAIL. As células BxPC-3 foram incubadas com anticorpo durante 1, 2, 4 e 6 horas. A ativação da Caspase-3/7 foi analisada em um ensaio de luminescência homogênea. RLU, unidades de luminescência relativa. Um exemplo representativo de quatro experimentos é mostrado.

[0065] A Figura 44 mostra a eficácia da combinação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G na presença ou ausência de reticulação de Fc pelos fragmentos $F(ab')_2$ de um anticorpo IgG anti-humano e comparação com o anticorpo anti-DR5 IgG1-DR5-CONA e a combinação de anticorpos WT IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 em um ensaio de viabilidade de 3 dias nas células de câncer de cólon humano HCT-15 aderentes e câncer pancreático BxPC-3. O anticorpo de ligação não alvo IgG1-b12 foi incluído como um controle negativo. Os gráficos mostram a média +/- desvio padrão de amostras em duplicata. Para ambas as linhagens de célula, um exemplo representativo de dois experimentos é mostrado.

[0066] A Figura 45 mostra a análise de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G

e IgG1-hDR5-05-E430G para induzir a ativação de complemento na ligação de célula alvo nas células CHO transfectadas com DR5 humano (A, C) ou cinomolgo (B, D). (A-B) Ensaio de CDC *in vitro* com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal reunido. A eficácia de CDC é apresentada como a lise percentual determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI). (C-D) A deposição de produtos da ativação de complemento na ligação de anticorpo na presença de soro esgotado em C5 é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência. O mAb IgG1-b12 contra HIV gp120 foi usado como uma não ligação de anticorpo de controle de isótipo.

[0067] A Figura 46 mostra o efeito de combinar a combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G com agentes terapêuticos diferentes como determinado em um ensaio de viabilidade em cinco linhagens de célula de câncer de cólon diferentes. Cinco exemplos são mostrados de uma triagem de sinergia de 100 compostos de classes terapêuticas diferentes.

[0068] A Figura 47 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G, ambos como agentes únicos e como uma combinação em comparação com os anticorpos parentais sem a mutação E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer de cólon humano COLO 205. (A) O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos indicados (0,5 mg/kg) como mostrado em tempo. (B) plotagem de Kaplan-Meier da progressão de tumor, com um corte ajustado em um volume de tumor >500 mm^3.

[0069] A Figura 48 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* da concentração de anticorpo anti-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 com e sem a mutação realçadora de hexamerização E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer de cólon humano HCT15. O

tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os anticorpos a 0,5 mg/kg é mostrado em tempo (A) e no dia 21 depois do início do tratamento (B). **P < 0,0011 (teste de Mann Whitney). Em (C) a porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 750 mm^3 é mostrada em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0070] A Figura 49 mostra a avaliação da eficácia *in vivo* da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-430G em combinação com 15 mg/kg de paclitaxel em um modelo de xenoenxerto subcutâneo com células de câncer pulmonar humano SK-MES-1. (A) O tamanho do tumor (média & SEM) em camundongos tratados com os compostos indicados é mostrado em tempo. (B) Volume de tumor por grupo de tratamento no dia 16. (C) A porcentagem de camundongos com os tamanhos de tumor menores do que 500 mm^3 é mostrada em uma plotagem de Kaplan-Meier.

[0071] A Figura 50 mostra a taxa de depuração em camundongos de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G, IgG1-hDR5-05-E430G administrados a 1 mg/kg i.v. ou a combinação dos dois anticorpos em comparação com os anticorpos WT parentais sem a mutação E430G. (A) A IgG humana total nas amostras de soro foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de quatro amostras diluídas em série. (B) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula D*1.000/AUC com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva concentração-tempo.

[0072] A Figura 51 mostra um ensaio de viabilidade com anticorpos de DR5 IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-CONA-E430G nas células de câncer de cólon humano COLO 205 fixadas. A introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G resultou na indução de matança. Os dados são apresentados como % de células viáveis calculada a partir da luminescência

relativa às amostras incubadas sem anticorpo (nenhum extermínio) e amostras incubadas com Estaurosporina (matança máxima). As barras de erro indicam desvio padrão.

Descrição detalhada da invenção

[0073] Na descrição das modalidades da invenção recorrer-se-á a terminologia específica em prol da clareza. Entretanto, a invenção não é intencionada a ser limitada aos termos específicos assim selecionados e é entendido que cada termo específico inclui todos os equivalentes técnicos que operem em uma maneira similar para realizar um propósito similar.

Definições

[0074] O termo “imunoglobulina” como aqui usado, se refere a uma classe de glicoproteínas estruturalmente relacionadas consistindo em dois pares de cadeias de polipeptídeo, um par de cadeias leves (L) de peso molecular baixo e um par de cadeias pesadas (H), todas as quatro potencialmente interconectadas pelas ligações de dissulfeto. A estrutura de imunoglobulinas foi bem distinguida. Ver por exemplo Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Em resumo, cada cadeia pesada tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada de anticorpos IgG tipicamente é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. As cadeias pesadas são interconectadas por intermédio de ligações de dissulfeto na chamada “região de dobradiça”. Cada cadeia leve tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve tipicamente é compreendida de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas adicionalmente em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis na sequência e/ou forma de alças estruturalmente definidas), também denominadas regiões determinantes de

complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de armação (FRs). Cada VH e VL é tipicamente composta de três CDRs e quatro FRs, arranjadas do terminal amino para o terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver também Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)). A menos que de outro modo estabelecido ou contradito pelo contexto, as sequências de CDR aqui são identificadas de acordo com as regras de IMGT (Brochet X., Nucl Acids Res. 2008; 36: W503-508 e Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212; ver também o endereço http da internet http://www.imgt.org/). A menos que de outro modo estabelecido ou contradito pelo contexto, referência às posições de aminoácido nas regiões constantes na presente invenção está de acordo com a numeração EU (Edelman *et al*., Proc Natl Acad Sci U S A. maio de 1969; 63(1): 78-85; Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição. 1991 NIH Publication No. 91-3242). O termo "região de dobradiça" como aqui usado é intencionado a se referir à região de dobradiça de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Assim, por exemplo a região de dobradiça de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 216 a 230 de acordo com a numeração EU.

[0075] O termo "região CH2" ou "domínio CH2" como aqui usado é intencionado a se referir à região CH2 de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Assim, por exemplo a região CH2 de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 231 a 340 de acordo com a numeração EU. Entretanto, a região CH2 também pode ser qualquer um dos outros isótipos ou alótipos como aqui descritos.

[0076] O termo "região CH3" ou "domínio CH3" como aqui usado é intencionado a se referir à região CH3 de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Assim, por exemplo a região CH3 de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 341 a 447 de acordo com a numeração

EU. Entretanto, a região CH3 também pode ser qualquer um dos outros isótipos ou alótipos como aqui descritos.

[0077] Os termos “região de fragmento cristalizável”, “região Fc”, “fragmento Fc” ou “domínio Fc”, que podem ser intercambiavelmente aqui usados, se referem a uma região de anticorpo compreendendo, arranjada do terminal amino para o terminal carbóxi, pelo menos uma região de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3. Uma região Fc de um anticorpo IgG1 pode, por exemplo, ser gerado pela digestão de um anticorpo IgG1 com papaína. A região Fc de um anticorpo pode mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (tais como células efetoras) e componentes do sistema de complemento tal como C1q, o primeiro componente no caminho clássico de ativação de complemento.

[0078] O termo “fragmento Fab” no contexto da presente invenção, se refere a um fragmento de uma molécula de imunoglobulina, que compreende as regiões variáveis da cadeia pesada e cadeia leve assim como a região constante da cadeia leve e a região CH1 da cadeia pesada de uma imunoglobulina. A “região CH1” se refere por exemplo à região de um anticorpo IgG1 humano correspondendo aos aminoácidos 118 a 215 de acordo com a numeração EU. Assim, o fragmento Fab compreende a região de ligação de uma imunoglobulina.

[0079] O termo “anticorpo” (Ab), como aqui usado se refere a uma molécula de imunoglobulina, um fragmento de uma molécula de imunoglobulina ou um derivado de cada um dos mesmos. O anticorpo da presente invenção compreende uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação de antígeno. A região Fc geralmente contém duas regiões CH2-CH3 e uma região conectora, por exemplo uma região de dobradiça. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve da molécula de imunoglobulina contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. O termo

"anticorpo" como aqui usado, também se refere, a menos que de outro modo especificado ou contradito pelo contexto, aos anticorpos policlonais, anticorpos oligoclonais, anticorpos monoclonais (tais como anticorpos monoclonais humanos), misturas de anticorpo, anticorpos policlonais recombinantes, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos humanos. Um anticorpo como gerado pode potencialmente possuir qualquer classe ou isótipo.

[0080] O termo "anticorpo humano", como aqui usado, se refere a anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações, inserções ou deleções introduzidas pela mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo "anticorpo humano", como aqui usado, não é intencionado a incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie, tal como um camundongo, foram enxertadas nas sequências de matriz humana.

[0081] O termo "anticorpo quimérico", como aqui usado, se refere a um anticorpo em que ambos os tipos de cadeia, isto é, a cadeia pesada e a cadeia leve são quiméricas como um resultado do engenheiramento de anticorpo. Uma cadeia quimérica é uma cadeia que contém um domínio variável estranho (originando de uma espécie não humana ou sintética ou engenheirada de qualquer espécie incluindo a humana) ligado a uma região constante de origem humana.

[0082] O termo "anticorpo humanizado, como aqui usado, se refere a um anticorpo no qual ambos os tipos de cadeia são humanizados como um resultado do engenheiramento de anticorpo. Uma cadeia humanizada é tipicamente uma cadeia na qual as regiões determinantes de

complementaridade (CDR) dos domínios variáveis são estranhas (originando de uma espécie outra que não a humana ou sintéticos) ao passo que o restante da cadeia é de origem humana. A avaliação da humanização está fundamentada na sequência de aminoácidos resultante e não na metodologia por si, que permite que protocolos outros que não enxerto sejam usados.

[0083] O termo “isótipo”, como aqui usado, se refere à classe da imunoglobulina (por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE ou IgM) que é codificada pelos genes da região constante de cadeia pesada. Para produzir um anticorpo canônico, cada isótipo de cadeia pesada deve ser combinado com uma cadeia leve capa (κ) ou lambda (λ).

[0084] O termo “alotipo”, como aqui usado, se refere à variação de aminoácido dentro de uma classe de isótipo na mesma espécie. O alotipo predominante de um isótipo de anticorpo varia entre indivíduos de etnia. As variações de alotipo conhecidas dentro do isótipo IgG1 da cadeia pesada resulta de 4 substituições de aminoácido na armação de anticorpo como ilustrada na Figura 1. Em uma modalidade o anticorpo da invenção é do alótipo IgG1m(f) como definido na SEQ ID NO: 29. Em uma modalidade da invenção o anticorpo é do alótipo IgG1m(z) como definido na SEQ ID NO: 30, do alótipo IgG1m(a) como definido na SEQ ID NO: 31, do alótipo IgG1m(x) como definido na SEQ ID NO: 32 ou qualquer combinação alotípica, tal como IgG1m(z,a), IgG1m(z,a,x), IgG1m(f,a) (de lange Exp Clin Immunogenet. 1989; 6(1): 7-17).

[0085] Os termos “anticorpo monoclonal”, “Ab monoclonal”, “composição de anticorpo monoclonal”, “mAb” ou similares, como aqui usados referem-se a uma preparação de moléculas de Ab de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma especificidade de ligação única e afinidade para um epítopo particular. Consequentemente, o termo “anticorpo humano monoclonal” se refere a Abs exibindo uma especificidade de ligação única que têm regiões variáveis e

constantes derivados das sequências da linha germinativa da imunoglobulina humana. Os mAbs humanos podem ser gerados por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico ou transcromossômico, tal como um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um repertório de transgene de cadeia pesada humano e um repertório de transgene de cadeia leve humano, rearranjados para produzir um anticorpo humano funcional e fundidos a uma célula imortalizada. Alternativamente, os mAbs humanos podem ser gerados recombinantemente.

[0086] O termo “miméticos de anticorpo” como aqui usado, se refere a compostos que, como os anticorpos, podem especificamente ligar antígenos, mas que não são estruturalmente relacionados aos anticorpos. Estes são usualmente peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos ou moléculas pequenas artificiais.

[0087] O termo “anticorpo biespecífico” se refere a um anticorpo tendo especificidades quanto a pelo menos dois epítopos diferentes, tipicamente não sobrepostos. Tais epítopos podem estar nos mesmos alvos ou diferentes. Os exemplos de classes diferentes de anticorpos biespecíficos compreendendo uma região Fc incluem mas não são limitados a: moléculas biespecíficas assimétricas por exemplo moléculas tipo IgG com domínios CH3 complementar e moléculas biespecíficas simétricas por exemplo moléculas alvejadoras duais tipo IgG recombinantes em que cada região da molécula de ligação de antígeno liga pelo menos dois epítopos diferentes.

[0088] Os exemplos de moléculas biespecíficas incluem mas não são limitados a Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO/2002/020039), Knobs-into-Holes (Genentech, WO9850431), CrossMAbs (Roche, WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253), moléculas heterodiméricas de Fc eletrostaticamente combinadas (Amgen, EP1870459 e WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-body, PIG- body e TIG- body (Pharmabcine),

Corpo de Domínio Enhenheirado com Troca de Filamento (SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), IgG1 e IgG2 Biespecífico (Pfizer/Rinat, WO11143545), armação Azymetric (Zymeworks/Merck, WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), XmAb (Xencor), Anticorpos biespecíficos bivalentes (Roche, WO2009/080254), IgG biespecífico (Eli Lilly), moléculas DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011/131746), DuetMab (Medimune, US2014/0348839), Biclonics (Merus, WO 2013/157953), NovImmune (κλBodies, WO 2012/023053), FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/151792), (DT)-Ig (GSK/Domantis), Anticorpo Dois-em-Um ou Fabs de Ação Dual (Genentech, Adimab), mAb2 (F-Star, WO2008003116), Zybodies® (Zyngenia), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), Domínio Variável Dual (DVD)-Ig® (Abbott, US 7.612.18), anticorpos de cabeça dupla de domínio dual (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Ts2Ab (MedImmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), fusões de scFv (Genentech/Roche, Novartis, Immunomedics, Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246), TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530), Fusões ScFv/Fc, SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Interceptor (Emergent), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART®) (MacroGenics, WO2008/157379, WO2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diabody (Imclone/Eli Lilly) e mAbs quimicamente reticulado (Karmanos Cancer Center) e mAbs covalentemente fundidos (AIMM therapeutics).

[0089] O termo “anticorpo de comprimento completo” quando aqui usado, se refere a um anticorpo (por exemplo, um anticorpo precursor ou variante) que contém todos os domínios constantes e variáveis de cadeia pesada e leve correspondendo àqueles que são normalmente encontrados em um anticorpo tipo selvagem desta classe ou isótipo.

[0090] O termo “oligômero” como aqui usado, se refere a uma

molécula que consiste em mais do que uma, mas um número limitado de unidades monoméricas (por exemplo, anticorpos) em contraste com um polímero que, pelo menos em princípio, consiste em um número ilimitado de monômeros. Os oligômeros exemplares são dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros. Prefixos gregos são frequentemente usados para designar o número de unidades monoméricas no oligômero, por exemplo um tetrâmero sendo composto de quatro unidades e um hexâmero de seis unidades. Igualmente, o termo "oligomerização", como aqui usado, é intencionado a se referir a um processo que converte moléculas para um grau finito de polimerização. Aqui, é observado, que anticorpos e/ou outras proteínas diméricas compreendendo regiões de ligação de alvo de acordo com a invenção podem formar oligômeros, tais como hexâmeros, por intermédio de associação não covalente de regiões Fc depois da ligação alvo, por exemplo, em uma superfície da célula.

[0091] Os termos "região de ligação de antígeno", "região de ligação a antígeno", "região de ligação" ou domínio de ligação a antígeno, como aqui usados, se referem a uma região de um anticorpo que é capaz de se ligar ao antígeno. Esta região de ligação é tipicamente definida pelos domínios VH e VL do anticorpo que podem ser subdivididos ainda em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis na sequência e/ou forma de alças estruturalmente definidas), também denominadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de armação (FRs). O antígeno pode ser qualquer molécula, tal como um polipeptídeo, por exemplo presente em uma célula, bactéria ou vírion ou em solução. Os termos "antígeno" e "alvo" podem, a menos que contradito pelo contexto, ser usados intercambiavelmente no contexto da presente invenção.

[0092] O termo "alvo", como aqui usado, se refere a uma molécula à qual a região de ligação a antígeno do anticorpo se liga. O alvo inclui

qualquer antígeno para o qual o anticorpo incitado é direcionado. Os termos “antígeno” e “alvo” podem em relação a um anticorpo ser usados intercambiavelmente e constituem o mesmo significado e propósito com respeito a qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção.

[0093] O termo “epítopo” significa um determinante de proteína capaz de ligação específica a um anticorpo. Os epítopos usualmente consistem em agrupamentos de superfície de blocos de construção tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar ou uma combinação das mesmas e usualmente têm características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Os epítopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos em que a ligação ao primeiro, mas não ao último é perdida na presença de solventes desnaturantes. O epítopo pode compreender resíduos de aminoácido diretamente envolvidos na ligação e outros resíduos de aminoácido, que não estão diretamente envolvidos na ligação, tais como resíduos de aminoácido que são eficazmente bloqueados pelo peptídeo de ligação específica ao antígeno (em outras palavras, o resíduo de aminoácido está dentro da pegada do peptídeo de especificamente específica ao antígeno).

[0094] O termo “ligação” como aqui usado se refere à ligação de um anticorpo a um antígeno ou alvo predeterminados, tipicamente com uma afinidade de ligação correspondendo a um K_D de cerca de 10^{-6} M ou menos, por exemplo 10^{-7} M ou menos, tal como cerca de 10^{-8} M ou menos, tal como cerca de 10^{-9} M ou menos, cerca de 10^{-10} M ou menos ou cerca de 10^{-11} M ou ainda menos quando determinado por exemplo pela tecnologia de ressonância plasmônica superficial (SPR) em um instrumento BIAcore 3000 usando o antígeno como o ligante e o anticorpo como o análito ou vice e versa e se liga ao antígeno predeterminado com uma afinidade correspondendo a um K_D que é pelo menos dez vezes mais baixo, tal como pelo menos 100 vezes mais baixo, por exemplo pelo menos 1.000 vezes mais baixo, tal como pelo menos

10.000 vezes mais baixo, por exemplo pelo menos 100.000 vezes mais baixo do que a sua afinidade quanto à ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) outro que não o antígeno predeterminado ou um antígeno intimamente relacionado. A quantidade com que a afinidade é mais baixa é dependente do K_D do anticorpo, de modo que quando o K_D do anticorpo é muito baixo (isto é, o anticorpo é altamente específico), então o grau com que a afinidade para o antígeno é mais baixa do que a afinidade para um antígeno não específico pode ser pelo menos 10.000 vezes. O termo "K_D" (M), como aqui usado, se refere às constantes de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular e é obtida dividindo-se k_d por k_a.

[0095] O termo "k_d" (s^{-1}), como aqui usado, se refere às constantes da taxa de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular. O dito valor também é aludido como o valor k_{off} ou constante de dissociação.

[0096] O termo "k_a" (M^{-1} x s^{-1}), como aqui usado, se refere às constantes da taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. O dito valor também é aludido como o valor k_{on} ou taxa de associação.

[0097] O termo "K_A" (M^{-1}), como aqui usado, se refere às constantes de equilíbrio de associação de uma interação anticorpo-antígeno e é obtida dividindo-se k_a por k_d.

[0098] Como aqui usado, o termo "afinidade" é a força de ligação de uma molécula, por exemplo um anticorpo, a uma outra, por exemplo um alvo ou antígeno, em um único sítio, tal como a ligação monovalente de um sítio de ligação de antígeno individual de um anticorpo a um antígeno.

[0099] Como aqui usado, o termo "avidez" se refere à força combinada de sítios de ligação múltiplos entre duas estruturas, tais como entre sítios de ligação de antígeno múltiplos de anticorpos interagindo simultaneamente com um alvo. Quando mais do que uma das interações de ligação estão presentes, as duas estruturas apenas dissociar-se-ão quando

todos os sítios de ligação dissociarem-se e assim, a taxa de dissociação será mais lenta do que para os primeiros sítios de ligação individuais e provendo deste modo uma maior força de ligação total eficaz (avidez) comparada com a força de ligação dos sítios de ligação individuais (afinidade).

[00100] O termo “mutação realçadora de hexamerização”, como aqui usado, se refere a uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 seja S440Y ou S440W. A mutação realçadora de hexamerização reforça as interações Fc-Fc entre anticorpos IgG vizinhos que são ligados a uma superfície da célula alvo, resultando na formação realçada de hexâmero dos anticorpos ligados ao alvo, enquanto que as moléculas de anticorpo permanecem monoméricas em solução como descrito na WO2013/004842; WO2014/108198.

[00101] O termo “agrupamento” como aqui usado, é intencionado a se referir à oligomerização de anticorpos, polipeptídeos, antígenos ou outras proteínas através de interações não covalentes.

[00102] Os termos “mutação repulsiva” ou “mutação autorrepulsiva” ou “mutação inibidora de hexamerização”, como aqui usado, se refere a uma mutação de uma posição de aminoácido da IgG1 humana que pode resultar na repulsão de carga entre aminoácidos na interface Fc-Fc, resultando no enfraquecimento da interação Fc-Fc entre dois polipeptídeos contendo regiões Fc adjacentes e assim inibição da hexamerização. Os exemplos de uma tal mutação repulsiva na IgG1 humana são K439E e S440K. A repulsão na interação Fc-Fc entre duas regiões Fc adjacentes contendo polipeptídeos na posição de uma mutação repulsiva pode ser neutralizada pela introdução de uma segunda mutação (mutação complementar) na posição de aminoácido que interage com a posição que abriga a primeira mutação. Esta segunda mutação pode estar presente no mesmo anticorpo ou em um segundo anticorpo. A combinação da primeira e segunda mutações resulta na

neutralização da repulsão e restauração das interações Fc-Fc e assim hexamerização. Os exemplos de tais primeira e segunda mutações são K439E (mutação repulsiva) e S440K (neutralização da repulsão pela K439E) e vice-versa S440K (mutação repulsiva) e K439E (neutralização da repulsão pela S440K).

[00103] O termo “mutação complementar”, como aqui usado, se refere a uma mutação de uma posição de aminoácido em um polipeptídeo contendo a região Fc que se refere a uma primeira mutação em uma região Fc adjacente contendo polipeptídeo que preferivelmente interage com o polipeptídeo contendo a região Fc contendo a mutação complementar devido à combinação das duas mutações nos dois polipeptídeos adjacentes contendo as regiões Fc. A mutação complementar e a primeira mutação relacionada podem estar presentes no mesmo anticorpo (intramolecular) ou em um segundo anticorpo (intermolecular). Um exemplo de mutações complementares intramoleculares é a combinação K409R e F405L que medeia a heterodimerização preferencial em um anticorpo biespecífico de acordo com a WO 2011/131746. A combinação das mutações K439E e S440K que resulta na neutralização da repulsão e restauração das interações Fc-Fc entre dois polipeptídeos contendo regiões Fc adjacentes e assim a hexamerização é um exemplo de mutações complementares que podem ser aplicadas tanto inter quanto intramolecularmente.

[00104] O termo “apoptose”, como aqui usado se refere ao processo de morte celular programada (PCD) que pode ocorrer em uma célula. Eventos bioquímicos levam às mudanças celulares características (morfologia) e morte. Estas mudanças incluem formação de bolhas, encolhimento celular, exposição à fosfatidilserina, perda da função mitocondrial, fragmentação nuclear, condensação de cromatina, ativação de caspase e fragmentação de DNA cromossômico. Em uma modalidade particular, a apoptose por um ou mais anticorpos anti-DR5 agonísticos pode ser determinada usando métodos

tais como, por exemplo, ensaios da ativação da caspase-3/7 descritos nos exemplos 19, 20, 25 e 45 ou exposição à fosfatidilserina descrita nos exemplos 19 e 25. O anticorpo anti-DR5 em uma concentração fixa de por exemplo 1 μg/mL pode ser adicionado às células aderidas e incubadas durante 1 a 24 horas. A ativação da Caspase-3/7 pode ser determinada usando-se kits especiais para este propósito, tais como o Kit PE Active Caspase-3 Apoptose da BD Pharmingen (Cat nº 550914) (exemplos 19 e 25) ou o ensaio da Caspase-Glo 3/7 da Promega (Cat nº G8091) (exemplos 20 e 45). A exposição à fosfatidilserina e a morte celular pode ser determinada usando-se kits especiais para este propósito, tais como o Kit I de detecção de Apoptose FITC Anexina V da BD Pharmingen (Cat nº 556547) (exemplos 19 e 25).

[00105] Os termos “morte celular programada” ou “PCD”, como aqui usados se referem à morte de uma célula em qualquer forma mediada por uma sinalização intracelular, por exemplo apoptose, autofagia ou necroptose.

[00106] O termo “Anexina V”, como aqui usado, se refere a uma proteína do grupo anexina que liga fosfatidilserina (PS) na superfície da célula.

[00107] O termo “ativação da caspase”, como aqui usado, se refere à clivagem de pró-formas inativas de caspases efetoras pelas caspases iniciadoras, levando à sua conversão em caspases efetoras, que por sua vez clivam os substratos de proteína dentro da célula para deflagrar a apoptose.

[00108] O termo “morte celular programada dependente de caspase”, como aqui usado se refere a qualquer forma de morte celular programada mediada pelas caspases. Em uma modalidade particular, a morte celular programada dependente de caspase por um ou mais anticorpos anti-DR5 agonísticos pode ser determinada comparando-se a viabilidade de uma cultura de célula na presença e ausência do inibidor de pan-caspase Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK) como descrito nos exemplos 18 e 44. O inibidor da pan-caspase Z-VAD-FMK (5 μM de concentração final) pode

ser adicionado às células aderidas em placas de fundo chato de 96 poços e incubadas durante uma hora a 37°C. Em seguida, a série de diluição da concentração de anticorpo (por exemplo partindo de por exemplo 20.000 ng/mL até 0,05 ng/mL de concentração final em diluições de 5 vezes) pode ser adicionada e incubada durante 3 dias a 37°C. A viabilidade celular pode ser quantificada usando kits especiais para este propósito, tais como o ensaio luminescente de viabilidade celular CellTiter-Glo da Promega (Cat nº G7571).

[00109] O termo "viabilidade celular", como aqui usado se refere à presença de células metabolicamente ativas. Em uma modalidade particular, a viabilidade celular depois da incubação com um ou mais anticorpos anti-DR5 agonísticos pode ser determinada pela quantificação do ATP presente nas células como descrito nos exemplos 8-18, 21-24, 38-44, 46 e 48. A série de diluição da concentração de anticorpo (por exemplo partindo de por exemplo 20.000 ng/mL até 0,05 ng/mL de concentração final in 5-fold diluições) pode ser adicionada às células em placas de fundo chato de 96 poços, meio pode ser usado como controle negativo e 5 μM de estaurosporina podem ser usados como controle positivo para a indução de morte celular. Depois de 3 dias de incubação a viabilidade celular pode ser quantificada usando kits especiais para este propósito, tais como o ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo da Promega (Cat nº G7571). A porcentagem de células viáveis pode ser calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = [(luminescência da amostra de anticorpo – luminescência da amostra de estaurosporina)/(luminescência sem amostra de anticorpo - luminescência da amostra de estaurosporina)]*100.

[00110] O termo "DR5", como aqui usado, se refere ao receptor da morte 5, também conhecido como CD262 e TRAILR2, que é uma proteína de membrana tipo I de passagem única com três domínios ricos em cisteína extracelular (CRD's), um domínio de transmembrana (TM) e um domínio

citoplásmico contendo um domínio da morte (DD). Nos seres humanos, a proteína DR5 é codificada por uma sequência de ácido nucleico codificando a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 46, (proteína DR5 humana: UniprotKB/Swissprot O14763).

[00111] Os termos “DR5 de ligação de anticorpo”, “anticorpo anti-DR5”, “anticorpo de ligação de DR5”, “anticorpo específico de DR5”, “anticorpo DR5” que podem ser intercambiavelmente aqui usados, se referem a qualquer epítopo de ligação de anticorpo na parte extracelular de DR5.”

[00112] O termo “agonista” como aqui usado, se refere a uma molécula tal como um anticorpo anti-DR5 que seja capaz de deflagrar uma resposta em uma célula quando ligado ao DR5, em que a resposta pode ser a morte celular programada. Que o anticorpo anti-DR5 é agonístico deve ser entendido como que o anticorpo estimula, ativa ou agrupa DR5 como o resultado da ligação anti-DR5 ao DR5. Isto é um anticorpo anti-DR5 agonístico compreendendo uma mutação de aminoácido na região Fc de acordo com a presente invenção ligada ao DR5 resulta na estimulação, agrupamento ou ativação de DR5 dos mesmos caminhos de sinalização intracelular como TRAIL ligado ao DR5. Em uma modalidade particular, a atividade agonística de um ou mais anticorpos pode ser determinada incubando-se as células alvos durante 3 dias com uma série de diluição da concentração de anticorpo (por exemplo de 20.000 ng/mL a 0,05 ng/mL de concentração final em diluições de 5 vezes). Os anticorpos podem ser adicionados diretamente quando as células são semeadas (descrito nos exemplos 8, 9, 10, 39) ou alternativamente as células são primeiro deixadas aderir às placas de fundo chato de 96 poços antes de adicionar as amostras de anticorpo (descrito nos exemplos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 48). A atividade agonística isto é o efeito agonístico pode ser quantificado medindo-se a quantidade de células viáveis usando kits especiais para este propósito, tais como o ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo da Promega

(Cat nº G7571).

[00113] Os termos “positivo em DR5” e “expressando DR5” como aqui usados, se referem a tecidos ou linhagens de célula que mostram ligação de um anticorpo específico de DR5 que pode ser medida com por exemplo citometria de fluxo ou imuno-histoquímica.

[00114] Uma “variante” ou “variante de anticorpo” da presente invenção é uma molécula de anticorpo que compreende uma ou mais mutações quando comparada a um anticorpo “precursor”. Os formatos de anticorpo precursor exemplares incluem, sem limitação, um anticorpo tipo selvagem, um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de anticorpo contendo Fc, um anticorpo biespecífico, um anticorpo humano, anticorpo humanizado, anticorpo quimérico ou qualquer combinação do mesmo.

[00115] As mutações exemplares incluem deleções, inserções e substituições de aminoácido de aminoácidos na sequência de aminoácidos precursora. As substituições de aminoácido podem trocar um aminoácido nativo presente na proteína tipo selvagem no lugar de um outro aminoácido de ocorrência natural ou no lugar de um derivado de aminoácido não de ocorrência natural. A substituição de aminoácido pode ser conservativa ou não conservativa. No contexto da presente invenção, as substituições conservativas podem ser definidas pelas substituições dentro das classes de aminoácidos refletidas em um ou mais das três tabelas seguintes:

Classes de resíduo de aminoácido para substituições conservativas

Resíduos Ácidos	Asp (D) e Glu (E)
Resíduos Básicos	Lys (K), Arg (R) e His (H)
Resíduos Não Carregados Hidrofílicos	Ser (S), Thr (T), Asn (N) e Gln (Q)
Resíduos Não Carregados Alifáticos	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Resíduos Não Carregados Não Polares	Cys (C), Met (M) e Pro (P)
Resíduos Aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) e Trp (W)

Classes de substituição conservativa de resíduo de aminoácido alternativo

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M

6	F	Y	W

Classificações Físicas e Funcionais Alternativas de Resíduos de Aminoácido

Resíduos contendo grupo álcool	S e T
Resíduos alifáticos	I, L, V e M
Resíduos associados com cicloalquenila	F, H, W e Y
Resíduos hidrofóbicos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Resíduos negativamente carregados	D e E
Resíduos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S e T
Resíduos positivamente carregados	H, K e R
Resíduos pequenos	A, C, D, G, N, P, S, T e V
Resíduos muito pequenos	
Resíduos envolvidos na formação de volta	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P e T
Resíduos flexíveis	Q, T, K, S, G, D, E e R

[00116] No contexto da presente invenção, uma substituição em uma variante é indicada como:

aminoácido original – posição – aminoácido substituído;

[00117] O código de três letras ou um código de uma letra, são usados, incluindo os códigos Xaa e X para indicar resíduo de aminoácido. Consequentemente, a notação “E345R” ou “Glu345Arg” significa, que a variante compreende uma substituição de Ácido glutâmico com Arginina na posição de aminoácido variante correspondendo ao aminoácido na posição 345 no anticorpo precursor.

[00118] Onde uma posição como tal não está presente em um anticorpo, mas a variante compreende uma inserção de um aminoácido, por exemplo: Posição –aminoácido substituído; a notação, por exemplo, “448E” é usada. Tal notação é particular relevante em conexão com modificação(ões) em uma série de polipeptídeos ou anticorpos homólogos. Similarmente quando a identidade dos resíduos de aminoácido(s) de substituição for imaterial: aminoácido original – posição; ou “E345”.

[00119] Para uma modificação onde o(s) aminoácido(s) original(is) e/ou aminoácido(s) substituído(s) pode(m) compreender mais do que um, mas não todos os aminoácidos, a substituição de Ácido glutâmico por Arginina, Lisina ou Triptofano na posição 345: “Glu345Arg,Lys,Trp” ou “E345R,K,W” ou “E345R/K/W” ou “E345 para R, K ou W” pode ser usado

intercambiavelmente no contexto da invenção. Além disso, o termo "uma substituição" abrange uma substituição em qualquer um dos outros dezenove aminoácidos naturais ou em outros aminoácidos, tais como aminoácidos não naturais. Por exemplo, uma substituição de aminoácido E na posição 345 inclui cada uma das seguintes substituições: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W e 345Y. Isto é, aliás, equivalente à designação 345X, em que o X designa qualquer aminoácido. Estas substituições também podem ser designadas E345A, E345C, etc ou E345A,C,ect ou E345A/C/ect. O mesmo se aplica em analogia a cada uma e todas as posições aqui mencionadas, para especificamente incluir aqui qualquer uma de tais substituições.

[00120] Para os propósitos da presente invenção, a identidade de sequência entre duas sequências de aminoácidos é determinada usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al*., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferivelmente versão 5.0.0 ou posterior. Os parâmetros usados são penalidade de interstício aberto de 10, penalidade de interstício de extensão de 0,5 e a matriz de substituição EBLOSUM62 (EMBOSS versão de BLOSUM62). A saída de Needle rotulada "identidade mais longa" (obtida usando a opção -nobrief) é usada como a identidade percentual e é calculada como segue:

(Resíduos Idênticos x 100)/(Comprimento de Alinhamento – Número Total de Interstícios no Alinhamento).

[00121] Para os propósitos da presente invenção, a identidade de sequência entre duas sequências de desoxirribonucleotídeo é determinada usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, supra) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et*

al., 2000, supra), preferivelmente a versão 5.0.0 ou posterior. Os parâmetros usados são penalidade de interstício aberto de 10, penalidade de interstício de extensão de 0,5 e a matriz de substituição EDNAFULL (EMBOSS versão de NCBI NUC4.4). A saída de Needle rotulada "identidade mais longa" (obtida usando a opção -nobrief) é usada como a identidade percentual e é calculada como segue:

(Desoxirribonucleotídeos idênticos x 100)/(Comprimento de Alinhamento – Número Total de Interstícios no Alinhamento).

[00122] A sequência de variantes de CDR pode diferir da sequência da CDR das sequências de anticorpo precursor através das substituições de aminoácidos pela maior parte conservativas, físicas ou funcionais no máximo em 5 mutações ou substituições selecionadas de aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais no total através das seis sequências da CDR da região de ligação de anticorpo, tal como no máximo 4 mutações ou substituições selecionadas de aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais, tal como no máximo 3 mutações ou substituições selecionadas de aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais, tal como no máximo 2 mutações selecionadas de aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais ou substituições, tais como no máximo 1 mutação ou substituição selecionada de um aminoácido conservativo, físico ou funcional, no total através das seis sequências da CDR da região de ligação de anticorpo. os aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais são selecionados dos 20 aminoácidos naturais encontrados isto é, Arg (R), His (H), Lys (K), Asp (D), Glu (E), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), Cys (C), Gly (G), Pro (P), Ala (A), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Trp (W), Tyr (Y) e Val (V).

[00123] A sequência de variantes de CDR pode diferir da sequência da CDR das sequências do anticorpo precursor através na maioria das vezes das substituições de aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais; por exemplo pelo menos cerca de 75%, cerca de 80% ou mais, cerca de 85% ou

mais, cerca de 90% ou mais, (por exemplo, cerca de 75 a 95%, tal como cerca de 92%, 93% ou 94%) das substituições na variante são mutações ou substituições selecionadas de substituições de resíduo de aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais. Os aminoácidos conservativos, físicos ou funcionais são selecionados dos 20 aminoácidos verificados isto é, Arg (R), His (H), Lys (K), Asp (D), Glu (E), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), Cys (C), Gly (G), Pro (P), Ala (A), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Trp (W), Tyr (Y) e Val (V).

[00124] Um aminoácido ou segmento em uma sequência que "corresponde a" um aminoácido ou segmento em uma outra sequência é um que se alinha com o outro aminoácido ou segmento usando um programa de alinhamento de sequência padrão tal como ALIGN, ClustalW ou similar, tipicamente em ajustes de default. Consequentemente um programa de alinhamento de sequência padrão pode ser usado para identificar qual aminoácido por exemplo em uma sequência de imunoglobulina corresponde a um aminoácido específico por exemplo na IgG1 humana. Além disso, um programa de alinhamento de sequência padrão pode ser usado para identificar a identidade de sequência por exemplo uma identidade de sequência com a SEQ ID NO: 29 de pelo menos 80% ou 85%, 90% ou pelo menos 95%. Por exemplo, o alinhamento de sequências mostrado na Figuras 1 pode ser usado para identificar qualquer aminoácido na região Fc de um alótipo IgG1 que corresponda a um aminoácido particular em um outro alótipo de uma sequência de Fc da IgG1.

[00125] O termo "vetor," como aqui usado, se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de induzir a transcrição de um segmento de ácido nucleico ligado no vetor. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que esteja na forma de uma alça de DNA circular de filamento duplo. Um outro tipo de vetor é um vetor viral, em que o segmento de ácido nucleico pode ser ligado dentro do genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma

em uma célula hospedeira dentro da qual eles são introduzidos (por exemplo vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos episssômicos). Outros vetores (tais como vetores mamíferos não episssômicos) podem ser integrados dentro do genoma de uma célula hospedeira na introdução dentro da célula hospedeira e deste modo são replicados juntos com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles são operativamente ligados. Tais vetores são aqui aludidos como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vetores de expressão"). No geral, os vetores de expressão de utilidade nas técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório específico, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados intercambiavelmente como o plasmídeo é a forma mais habitualmente usada de vetor. Entretanto, a presente invenção é intencionada a incluir outras de tais formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (tais como retrovírus defeituosos de replicação, adenovírus e vírus adeno associados), que sirvam para funções equivalentes.

[00126] O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como aqui usado, é intencionado a se referir a uma célula dentro da qual um vetor de expressão foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos são intencionados a se referir não apenas à célula objeto particular, mas também à progênie de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido às influências mutacionais ou ambientais, tal progênie pode, de fato, não ser idêntica à célula precursora, mas é ainda incluída dentro do escopo do termo "célula hospedeira" como aqui usado. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, transfectomas, tais como células CHO-S, células CHO DG44, células HEK-293F, células Expi293F, PER.C6, células NS0 e células linfocíticas e células procarióticas tais como *E. coli* e outros hospedeiros

eucarióticos tais como células vegetais e fungos, assim como células procarióticas tais como *E. coli*.

Modalidades específicas da invenção

[00127] Como descrito acima, em um primeiro aspecto principal, a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo:

a. um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo à E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU,

b. um tampão de histidina, e

c. cloreto de sódio,

em que o pH da composição está entre 5,5 e 7,4.

[00128] Em uma modalidade a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo:

a. um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 seja S440Y ou S440W,

b. um tampão de histidina, e

c. cloreto de sódio,

em que o pH da composição está entre 5,5 e 7,4.

[00129] A composição farmacêutica da invenção é tipicamente uma solução aquosa líquida.

[00130] Em uma modalidade da composição farmacêutica da invenção, a composição compreende de 5 mM a 100 mM de histidina, por exemplo de 5 mM a 75 mM, tal como de 10 mM a 50 mM, por exemplo de 15 mM a 45 mM, tal como de 20 mM a 40 mM, por exemplo de 25 a 35 mM, tal como de 28 mM a 32 mM, por exemplo 30 mM de histidina.

[00131] Em uma modalidade, o pH é de 5,8 a 7,2, tal como 5,5 a 6,5, por exemplo 5,8 a 6,2, por exemplo 5,9 a 6,1, tal como 6,0.

[00132] Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende de 25 mM a 500 mM de cloreto de sódio, por exemplo de 25 mM a 250 mM, tal como de 50 mM a 250 mM, por exemplo de 100 mM a 200 mM, tal como de 125 mM a 175 mM, por exemplo 150 mM de cloreto de sódio.

[00133] Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 40 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 20 mg/ml de anticorpo no pH 6.

[00134] Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 15 mg/ml a 25 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 20 mg/ml de anticorpo no pH 6.

[00135] Em uma modalidade adicional, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 20 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 10 mg/ml de anticorpo no pH 6,0.

[00136] Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 20 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 20 mg/ml de anticorpo no pH 6,0.

[00137] Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto

de sódio e de 2 mg/ml a 40 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 20 mg/ml de anticorpo no pH 6,0.

[00138] Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 40 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, tal como em que a composição compreenda 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 30 mg/ml de anticorpo no pH 6,0.

[00139] Em uma modalidade adicional, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 40 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, tal como em que a composição compreenda 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 40 mg/ml de anticorpo no pH 6,0.

[00140] As composições farmacêuticas podem ser formuladas com carreadores ou diluentes adicionais farmaceuticamente aceitáveis assim como quaisquer outros adjuvantes e excipientes conhecidos de acordo com técnicas convencionais tais como aquelas divulgadas em (Rowe *et al*., Handbook of Pharmaceutical Excipients, junho de 2012, ISBN 9780857110275). Tais carreadores ou diluentes opcionais farmaceuticamente aceitáveis adicionais assim como quaisquer outros adjuvantes e excipientes conhecidos devem ser adequados para o anticorpo e o modo escolhido de administração. A adequabilidade para carreadores e outros componentes de composições farmacêuticas é determinado com base na falta de impacto negativo significante sobre as propriedades biológicas desejadas do composto ou composição farmacêutica escolhidos da presente invenção (por exemplo, menos do que um impacto substancial (10% ou menos de inibição relativa, 5% ou menos de inibição relativa, etc.) na ligação a antígeno).

[00141] Os carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem qualquer um e todos os solventes adequados, meios de dispersão, revestimentos,

agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de isotonicidade, antioxidantes e agentes retardantes de absorção e similares que são fisiologicamente compatíveis com os outros componentes da composição. Outros exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da presente invenção incluem água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, etanol, dextrose, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e similares) e misturas adequadas dos mesmos. Uma composição farmacêutica da presente invenção pode incluir adicionalmente enchedores, sais, tampões, detergentes (por exemplo, um detergente não iônico, tal como Tween-20 ou Tween-80), estabilizantes (por exemplo, açúcares ou aminoácidos livres de proteína), preservantes, fixadores de tecido, solubilizantes e/ou outros materiais adequados para a inclusão em uma composição farmacêutica.

[00142] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da invenção não compreende um tensoativo. Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica não compreende um crioprotetor. Em uma modalidade adicional, nenhum outro excepiente além do tampão de histidina e cloreto de sódio é adicionado à preparação de anticorpo para preparar a composição.

[00143] Os níveis de dosagem reais do anticorpo nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade de anticorpo que seja eficaz para se obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo particulares de administração, sem que sejam tóxicos para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares utilizadas na presente invenção, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular que é utilizado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares utilizadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico

médico anterior do paciente sendo tratado e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas. As composições farmacêuticas para injeção ou infusão devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem.

[00144] Em uma modalidade, a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é de 0,5 mg/ml a 250 mg/ml, tal como de 1 mg/ml a 100 mg/ml, por exemplo de 1 mg/ml a 50 mg/ml, tal como de 2 mg/ml a 20 mg/ml, por exemplo de 5 ml/ml a 15 mg/ml, tal como 10 mg/ml.

[00145] Em uma modalidade preferida da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é 20 mg/ml. Em uma modalidade da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é de 18 a 20 mg/ml. Em uma modalidade da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é de 19 a 21 mg/ml.

[00146] Em uma modalidade da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é 40 mg/ml.

[00147] Em uma modalidade da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é 60 mg/ml.

[00148] Em uma modalidade da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é 80 mg/ml.

[00149] Em uma modalidade da invenção a concentração de anticorpo na composição farmacêutica é 100 mg/ml.

Anticorpos formulados na composição farmacêutica da invenção

[00150] Como descrito acima, o anticorpo formulado na composição farmacêutica da invenção compreende uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 seja S440Y ou S440W. As posições correspondendo a E430, E345 e S440 na IgG1 humana de acordo

com a numeração EU estão localizadas no domínio CH3 da região Fc.

[00151] O anticorpo na composição farmacêutica da invenção compreende uma região Fc compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia pesada, em que uma mutação em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU está presente tanto na primeira quanto na segunda cadeia pesada ou menos preferido, está presente apenas em uma das cadeias pesadas. No contexto da presente invenção o termo mutação realçadora da hexamerização se refere a uma mutação de aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W. A mutação realçadora de hexamerização reforça as interações Fc-Fc entre os anticorpos compreendendo a mutação quando ligados ao alvo correspondente em uma superfície da célula (WO2013/004842; WO2014/108198).

[00152] Em uma modalidade, a região Fc do anticorpo compreende uma mutação correspondendo a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y ou S440W na IgG1 humana, na numeração EU. Assim o anticorpo compreende uma mutação selecionada do grupo de: E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W na IgG1 humana, na numeração EU. Com isto são providas modalidades que permitem a hexamerização realçada de anticorpos na ligação de antígeno de superfície celular. O anticorpo compreende uma região Fc compreendendo uma primeira cadeia pesada e uma segunda cadeia pesada, em que uma das mutações realçadoras de hexamerização mencionadas acima podem estar presentes na primeira e/ou na segunda cadeia pesada.

[00153] Em uma modalidade preferida, a região Fc compreende uma mutação correspondendo a E430G ou E345K na IgG1 humana na numeração EU. Assim a região Fc compreende uma mutação selecionada de E430G e E345K.

[00154] Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma mutação em uma posição de aminoácido correspondendo a E430 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU, em que a mutação é selecionada do grupo consistindo em: E430G, E430S, E430F e E430T. Em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação correspondendo a E430G. Assim, em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação E430G.

[00155] Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma mutação em uma posição de aminoácido correspondendo a E345 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU, em que a mutação é selecionada do grupo consistindo em: E345K, E345Q, E345R e E345Y. Em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação correspondendo a E345K. Assim em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação E345K.

[00156] Em uma modalidade o anticorpo compreende uma mutação em uma posição de aminoácido correspondendo a S440 na IgG1 humana de acordo com a numeração EU, em que a mutação é selecionada do grupo consistindo em: S440W e S440Y. Em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação correspondendo a S440Y. Assim, em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação S440Y.

[00157] Em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação inibidora de hexamerização adicional tal como K439E ou S440K na IgG1 humana, na numeração EU. A mutação inibidora de hexamerização tal como K439E ou S440K impedem a interação Fc-Fc com anticorpos compreendendo a mesma mutação inibidora de hexamerização, mas combinando-se anticorpos com uma mutação K439E e anticorpos com uma mutação S440K o efeito inibidor é neutralizado e as interações Fc-Fc é restaurada. Em uma modalidade o anticorpo compreende uma outra mutação em uma posição de aminoácido correspondendo a uma das seguintes posições S440 ou K439 na IgG1 humana, na numeração EU. Em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação adicional em uma posição correspondendo a S440

ou K439, com a condição de que a mutação adicional não está na posição S440 se a mutação realçadora de hexamerização está em S440. Os anticorpos compreendendo uma mutação em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 de acordo com a presente invenção e uma mutação adicional em uma posição de aminoácido correspondendo a K439 tal como uma mutação K439E não forma oligômeros com anticorpos compreendendo uma mutação adicional em uma posição de aminoácido correspondendo a K439 tal como uma mutação K439E. Entretanto, anticorpos compreendendo a mutação realçadora de hexamerização em E430, E345 ou S440 e uma mutação adicional em K439 uma tal K439E forma oligômeros com anticorpos compreendendo uma mutação realçadora de hexamerização na E430 ou E345 e uma mutação adicional em S440 tal como S440K. Os anticorpos compreendendo uma mutação em uma posição correspondendo a E430 ou E345 de acordo com a presente invenção e uma mutação adicional em uma posição de aminoácido correspondendo a S440 tal como uma mutação S440K não forma oligômeros com anticorpos compreendendo uma mutação adicional em uma posição de aminoácido correspondendo a S440 tal como uma mutação S440K. Entretanto, anticorpos compreendendo a mutação realçadora de hexamerização em E430 ou E345 e uma mutação adicional em S440 uma tal S440K forma oligômeros com anticorpos compreendendo uma mutação realçadora de hexamerização em E430 ou E345 e uma mutação adicional em K439 tal como K439E. Em uma modalidade, a região Fc compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como E430G e uma mutação inibidora de hexamerização tal como K439E. Em uma modalidade a região Fc compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como E345K e uma mutação inibidora de hexamerização tal como K439E. Em uma outra modalidade, a região Fc compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como E430G e uma mutação inibidora de hexamerização tal como S440K. Em uma modalidade a região Fc compreende uma mutação

realçadora de hexamerização tal como E345K e uma mutação inibidora de hexamerização tal como S440K. Em uma modalidade a região Fc compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como S440Y e uma mutação inibidora de hexamerização tal como K439E. Deste modo, modalidades são providas que permitem a hexamerização exclusiva entre combinações de anticorpos compreendendo uma mutação K439E e anticorpos compreendendo uma mutação S440K.

[00158] Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica da invenção compreende um anticorpo anti-DR5, isto é um anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno que se liga ao DR5.

[00159] Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 200 mg/ml de anticorpo anti-DR5 em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 20 mg/ml de anticorpo anti-DR5 no pH 6,0. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 10 mg/ml a 40 mg/ml de anticorpo anti-DR5 em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 15 mg/ml a 30 mg/ml de anticorpo anti-DR5 em um pH entre 5,5 e 6,5.

[00160] Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 18 mg/ml a 25 mg/ml de anticorpo anti-DR5 em um pH entre 5,5 e 6,5 por exemplo em um pH entre 5,8 e 6,2.

[00161] Em uma modalidade da invenção a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 10 mg/ml de anticorpo anti-DR5 no pH 6,0. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 30 mg/ml de

anticorpo anti-DR5 no pH 6,0. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 40 mg/ml de anticorpo anti-DR5 no pH 6,0. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 50 mg/ml de anticorpo anti-DR5 no pH 6,0. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 100 mg/ml de anticorpo anti-DR5 no pH 6,0.

[00162] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 a 200 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 a 200 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 10 mg/ml do dito primeiro anticorpo anti-DR5, 10 mg/ml do dito segundo anticorpo anti-DR5, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00163] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 10 mg/ml a 40 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 10 mg/ml a 40 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5.

[00164] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 10 mg/ml a 40 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 10 mg/ml a 40 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre

5,8 e 6,2.

[00165] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 15 mg/ml a 30 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 15 mg/ml a 30 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5.

[00166] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 15 mg/ml a 30 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 15 mg/ml a 30 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,8 e 6,2.

[00167] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica também pode conter impurezas, tais como impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. As impurezas de proteína podem ser menores do que 0,1 mg/ml. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende 0,1 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende menos do que 0,1 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende menos do que 0,09 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende menos do que 0,07 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende menos do que 0,05 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende menos do que 0,03

mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo. Em uma modalidade a composição farmacêutica compreende menos do que 0,001 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo.

[00168] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 15 mg/ml a 30 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 15 mg/ml a 30 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e menos do que 0,1 mg/ml de impurezas de proteína por exemplo impurezas de anticorpo em um pH entre 5,8 e 6,2.

[00169] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 20 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 20 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 20 mg/ml de um primeiro anticorpo anti-DR5, 20 mg/ml de um segundo anticorpo anti-DR5, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00170] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 40 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 40 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 40 mg/ml de um primeiro anticorpo anti-DR5, 40 mg/ml de um segundo anticorpo anti-DR5, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00171] A molécula DR5 humana (Uniprot O14763) é compreendida de 440 aminoácidos incluindo um peptídeo de sinalização nas primeiras posições de 1 a 55, seguidos pelo domínio extracelular nas posições 56 a 210, um domínio de transmembrana nas posições 211 a 231 e um domínio citoplásmico nas posições 232 a 440. O domínio extracelular é compreendido de uma sequência de 155 aminoácidos. A isoforma curta de DR5 (Uniprot O14763-2) é perdida de 185 a 213 do domínio extracelular comparada com a versão longa (Uniprot O14763) compreendendo os aminoácidos na posição 56 a 210.

[00172] Em uma modalidade o anticorpo anti-DR5 compreende uma região de ligação a antígeno ligando a um epítopo dentro do domínio extracelular de DR5.

[00173] Em uma modalidade o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno ligando ao mesmo sítio de ligação como TRAIL ou um sítio de ligação sobrepondo com o sítio de ligação de TRAIL. O motivo de ligação de TRAIL está localizado na CRD2 e CRD3 com base em uma estrutura cristalina de TRAIL em complexo com o ectodomínio de DR5 (Hymowitz *et al*., Mol Cell. 1999 Oct;4(4): 563-71). Isto é, em uma modalidade o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno ligando à mesma região de ligação no DR5 como TRAIL. Assim em uma modalidade o anticorpo de DR5 se liga à CRD2 e/ou CRD3 no DR5. Em uma modalidade o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno que bloqueia a ligação de TRAIL ao DR5. Em uma modalidade o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno que compete com a ligação de TRAIL ao DR5. Em uma modalidade o anticorpo bloqueia o extermínio mediado induzido por TRAIL tal como a apoptose induzida por TRAIL.

[00174] Em uma outra modalidade o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno que se liga a um epítopo no DR5 isto é diferente do sítio de ligação de TRAIL. Em uma modalidade o anticorpo compreende uma

região de ligação a antígeno que se liga a uma região de ligação diferente no DR5 do que TRAIL. Em uma modalidade o anticorpo não bloqueia o extermínio mediado induzido por TRAIL tal como apoptose induzida por TRAIL.

[00175] Em uma modalidade da invenção o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno que se liga a um epítopo no DR5 compreendendo ou requerendo um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 116 a 138 e um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 139 a 166 da SEQ ID NO: 46. Isto é a região de ligação a antígeno se liga ao ou requer para a ligação ao DR5 um ou mais aminoácidos localizados dentro das posições 116 a 138 e um ou mais aminoácidos localizados dentro das posições 139 a 166. Isto é, a região de ligação a antígeno se liga a um ou mais aminoácidos compreendidos em uma sequência deve ser entendido como a região de ligação a antígeno está em contato com ou diretamente interage com um ou mais aminoácidos dentro da sequência. Isto é, a região de ligação a antígeno requer um ou mais aminoácidos dentro de uma sequência significa que nenhum contato ou interação direta entre a região de ligação a antígeno e um ou mais aminoácidos na sequência é necessário, mas que um ou mais aminoácidos são requeridos para manter a estrutura tridimensional do epítopo.

[00176] O epítopo ou região de ligação no domínio extracelular no DR5 humano dos anticorpos da presente invenção podem ser determinados pelo uso do método de moléculas de DR5 trocadas de domínio como descrito no Exemplo 6. Em resumo, as moléculas de DR5 trocadas de domínio são transitoriamente expressas nas células CHO, a ligação de anticorpos às moléculas de DR5 humano trocadas no domínio é determinada por um ensaio FACS. A perda de ligação com as moléculas de DR5 humano trocadas no domínio indicam que o domínio trocado de DR5 humano contém um ou mais aminoácidos que estão envolvidos na ligação ao anticorpo.

[00177] Em uma outra modalidade preferida do anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno que se liga a um epítopo no DR5 compreendendo ou requerendo um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 79 a 138 da SEQ ID NO: 46.

[00178] Em uma modalidade o anticorpo anti-DR5 compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

b) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

c) (VH) SEQ ID NOs 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs 13, RTS, 14;

d) (VH) SEQ ID NOs 16, 17, 18 e VL) SEQ ID NOs 21, GAS, 22 ou

e) a (VH) CDR1, CDR2, CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em qualquer um de a) a d) acima tendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas seis sequências da CDR.

[00179] Em uma modalidade o anticorpo anti-DR5 compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6.

[00180] Em uma modalidade o anticorpo anti-DR5 compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NOs 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs 13, RTS, 14.

[00181] Isto é, em uma modalidade até cinco mutações tais como substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações por exemplo substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00182] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3, em que a dita região VH e a dita região VL tem pelo menos 75%, 80% , 85 % 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada nas seis sequências da CDR selecionada do grupo consistindo em:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

b) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

c) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14; e

d) (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e VL) SEQ ID NOs: 21, GAS, 22.

[00183] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em

qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3, em que a dita região VH e a dita região VL tem pelo menos 75%, 80% , 85 % 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada nas seis sequências da CDR selecionada do grupo consistindo em:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6.

[00184] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3, em que a dita região VH e a dita região VL tem pelo menos 75%, 80% , 85 %, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada nas seis sequências da CDR selecionadas do grupo consistindo em:

a) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[00185] Em uma modalidade o anticorpo anti-DR5 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências da CDR selecionadas de um dos grupos consistindo em:

a) (VH) SEQ ID NOs 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs 5, FAS, 6 ou

b) (VH) SEQ ID NOs 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs 13, RTS,

14 ou

c) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em qualquer um de (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR. Isto é em uma modalidade até cinco mutações tais como substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações por exemplo substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00186] Em uma modalidade o anticorpo anti-DR5 compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de CDR selecionadas de um dos grupos consistindo em:

a) (VH) SEQ ID NOs 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs 5, FAS, 6 ou

b) (VH) SEQ ID NOs 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs 13, RTS, 14 ou

c) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) ou (b) acima tendo até cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR.

[00187] Isto é, em uma modalidade até cinco mutações tais como substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou

cinco mutações por exemplo substituições são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das três CDRs ou da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituição é feita através das três CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições são feitas através das seis CDRs da região VL, em que as mutações por exemplo substituições são conservativas ou dizem respeito aos aminoácidos com propriedades físicas ou funcionais similares e preferivelmente não modificam a afinidade de ligação ao DR5.

[00188] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL), em que a dita região VH e a dita região VL tem pelo menos 75%, 80% , 85 % 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada nas sequências VH e VL selecionadas do grupo consistindo em:

a) (VH) SEQ ID NO: 4 e (VL) SEQ ID NO: 7;

b) (VH) SEQ ID NO: 9 e (VL) SEQ ID NO: 7;

c) (VH) SEQ ID NO: 12 e (VL) SEQ ID NO: 15;

d) (VH) SEQ ID NO: 19 e (VL) SEQ ID NO: 23; e

e) (VH) SEQ ID NO: 20 e (VL) SEQ ID NO: 23.

[00189] Em uma modalidade o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NO: 4 e (VL) SEQ ID NO: 7;

b) (VH) SEQ ID NO: 9 e (VL) SEQ ID NO: 7;

c) (VH) SEQ ID NO: 12 e (VL) SEQ ID NO: 15;

d) (VH) SEQ ID NO: 19 e (VL) SEQ ID NO: 23;

e) (VH) SEQ ID NO: 20 e (VL) SEQ ID NO: 23 ou

f) a (VH) e (VL) como definidas em qualquer um de a) a e) acima tendo uma a 10 mutações ou substituições no total através das ditas sequências (VH) e (VL).

[00190] Isto é, em uma modalidade até 10 mutações tais como substituições no total são permitidas através das regiões VH e VL definidas pelas sequências VH e VL. Em algumas modalidades da invenção até dez mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez mutações por exemplo substituições são feitas através das sequências VH ou VL. Em uma modalidade da invenção até 10 mutações ou substituições são feitas na sequência VH e nenhuma mutação é feita na sequência VL. Em uma modalidade da invenção nenhuma mutação é feita na sequência VH e até dez mutações por exemplo substituições são feitas na sequência VL. Assim são as modalidades contanto que permitam até 10 mutações tais como substituições através das sequências VH e VL, em que as mutações tais como substituições são conservativas ou dizem respeito aos aminoácidos com propriedades físicas ou funcionais similares, permitindo deste modo mutações por exemplo substituições dentro das sequências VH e VL sem modificar a afinidade de ligação ou função do anticorpo anti-DR5.

[00191] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade da presente invenção o anticorpo é do isótipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em uma modalidade preferida da invenção o anticorpo é um anticorpo IgG1.

[00192] Em uma modalidade o anticorpo é de um alótipo IgG1m(f), IgG1m(z), IgG1m(a) ou um IgG1m(x) ou qualquer combinação de alótipo, tal como IgG1m(z,a), IgG1m(z,a,x), IgG1m(f,a). Em uma modalidade preferida o anticorpo é uma IgG1m(f).

[00193] Em uma modalidade a cadeia leve é uma cadeia leve capa. Em uma modalidade a cadeia leve é um alótipo Km3. Em uma modalidade o

anticorpo compreende uma região Fc compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em:

a) SEQ ID NO: 29;

b) SEQ ID NO: 30;

c) SEQ ID NO: 31;

d) SEQ ID NO: 32 ou

e) uma sequência de aminoácidos definida em qualquer um de a) a d) opcionalmente tendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas sequências.

[00194] Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através da região Fc. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações por exemplo substituições, são permitidas através da região Fc.

[00195] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 39 e em que a HC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada nas sequências HCs selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 33;

b) (HC) SEQ ID NO: 34;

c) (HC) SEQ ID NO: 35;

d) (HC) SEQ ID NO: 36;

e) (HC) SEQ ID NO: 37; e

f) (HC) SEQ ID NO: 38.

[00196] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia

pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 39 e em que a HC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada na (HC) SEQ ID NO: 38.

[00197] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, a 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39 e em que a HC tem a sequência de aminoácidos como apresentada na HCs sequências selecionada do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 33;

b) (HC) SEQ ID NO: 34;

c) (HC) SEQ ID NO: 35;

d) (HC) SEQ ID NO: 36;

e) (HC) SEQ ID NO: 37; e

f) (HC) SEQ ID NO: 38.

[00198] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, a 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39 e em que a HC tem a sequência de aminoácidos como apresentada em f) (HC) SEQ ID NO: 38.

[00199] Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 39 e em que a HC compreende uma das sequências selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 33;

b) (HC) SEQ ID NO: 34;

c) (HC) SEQ ID NO: 35;

d) (HC) SEQ ID NO: 36;

e) (HC) SEQ ID NO: 37; e

f) (HC) SEQ ID NO: 38; ou

g) a (HC) como definida em qualquer um de a) a f) acima tendo uma a dez mutações no total através das ditas sequências (HC).

[00200] Isto é, em uma modalidade até 10 mutações tais como substituições no total são permitidas através das cadeias pesadas definidas pela sequência de cadeia pesada. Em algumas modalidades da invenção até dez mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez mutações por exemplo substituições são feitas através da sequência de cadeia pesada. Assim são as modalidades contanto que permitam até 10 mutações tais como substituições através da sequência de cadeia pesada, em que as mutações tais como substituições são conservativas ou dizem respeito aos aminoácidos com propriedades físicas ou funcionais similares, permitindo deste modo mutações ou substituições dentro da sequência de cadeia pesada sem modificar a afinidade de ligação ou função do anticorpo anti-DR5.

[00201] Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 39 e em que a HC compreende a sequência da SEQ ID NO: 38.

[00202] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 43 e em que a HC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de

sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada nas sequências HCs selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 40;

b) (HC) SEQ ID NO: 41; e

c) (HC) SEQ ID NO: 42.

[00203] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 43 e em que a HC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos como apresentada na (HC) SEQ ID NO: 42.

[00204] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, a 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 43 e em que a HC tem a sequência de aminoácidos como apresentada nas sequências HCs selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 40;

b) (HC) SEQ ID NO: 41; e

c) (HC) SEQ ID NO: 42.

[00205] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades aqui divulgadas compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC tem pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, a 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 43 e em que a HC tem a sequência de aminoácidos como apresentada na (HC) SEQ ID NO: 42.

[00206] Em uma modalidade o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 43 e em que a HC compreende uma das sequências selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 40;

b) (HC) SEQ ID NO: 41;

c) (HC) SEQ ID NO: 42; ou

d) a (HC) como definida em qualquer um de a) a c) acima tendo uma a dez mutações por exemplo substituições no total através das ditas sequências (HC).

[00207] Isto é, em uma modalidade até 10 mutações tais como substituições no total são permitidas através das cadeias pesadas definidas pelas sequências de cadeia pesada. Em algumas modalidades da invenção até dez mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez mutações por exemplo substituições são feitas através das sequências de cadeia pesada. Assim são as modalidades contanto que permitam até 10 mutações tais como substituições através da sequência de cadeia pesada, em que as mutações tais como substituições são conservativas ou dizem respeito aos aminoácidos com propriedades físicas ou funcionais similares, permitindo deste modo mutações tais como substituições dentro da sequência de cadeia pesada sem modificar a afinidade de ligação ou função do anticorpo anti-DR5.

[00208] Em uma modalidade o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 43 e em que a HC compreende a sequência da SEQ ID NO: 42.

[00209] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo humano, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

[00210] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 e o

dito anticorpo anti-DR5 é agonístico. Que o anticorpo é agonístico deves ser entendido como que o anticorpo agrupa, estimula ou ativa DR5. Em uma modalidade, um anticorpo anti-DR5 agonístico da presente invenção ligado ao DR5 ativa os mesmos caminhos intracelulares como TRAIL ligado ao DR5. A atividade agonística de um ou mais anticorpos pode ser determinada incubando-se as células alvos expressando DR5, tais como as células COLO 205 (ATCC CCL-222) ou células HCT 116 (ATCC CCL-247), durante 3 dias com uma série de diluição da concentração de anticorpo (por exemplo de 20.000 ng/mL a 0,05 ng/mL de concentração final em diluições de 5 vezes). Os anticorpos podem ser adicionados diretamente quando as células são semeadas (descrito nos exemplos 8, 9, 10, 39) ou alternativamente as células são primeiro deixadas aderir às placas de fundo chato de 96 poços antes de adicionar as amostras de anticorpo (descrito nos exemplos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 48). A atividade agonística isto é o efeito agonístico pode ser quantificada medindo-se a quantidade de células viáveis usando kits especiais para este propósito, tais como o ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo da Promega (Cat nº G7571).

[00211] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 e o dito anticorpo anti-DR5 tem atividade agonística realçada. Que o anticorpo anti-DR5 tem atividade deve ser entendido como o anticorpo sendo capaz de agrupar DR5 ou ativar pelo menos os mesmos caminhos intracelulares como TRAIL ligado ao DR5. Isto é, o anticorpo anti-DR5 com atividade agonística realçada é capaz de induzir nível aumentado de apoptose ou morte celular programada em uma célula ou tecido expressando DR5 comparado ao TRAIL ou um anticorpo IgG1 do tipo selvagem contra DR5.

[00212] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 e o dito anticorpo anti-DR5 induz a morte celular programada em uma célula alvo. Em uma modalidade da presente invenção o anticorpo anti-DR5 induz a

morte celular dependente da caspase. A morte celular dependente da caspase pode ser induzida pela ativação de caspase-3 e/ou caspase-7. Em uma modalidade da invenção o anticorpo anti-DR5 induz a morte celular dependente da caspase-3 e/ou caspase-7. Em uma modalidade da presente invenção o anticorpo induz apoptose. A apoptose por um ou mais anticorpos anti-DR5 agonísticos pode ser determinada usando métodos tais como, por exemplo, ensaios de ativação da caspase-3/7 descritos nos exemplos 19, 20, 25 e 45 ou exposição à fosfatidilserina descrita nos exemplos 19 e 25. Anticorpo anti-DR5 em uma concentração fixa de por exemplo 1 μg/mL pode ser adicionado às células aderidas e incubadas durante 1 a 24 horas. A ativação da caspase-3/7 pode ser determinada usando-se kits especiais para este propósito, tal como o Kit PE Active Caspase-3 Apoptosis da BD Pharmingen (Cat nº 550914) (exemplo 19 e 25) ou o ensaio da Caspase-Glo 3/7 da Promega (Cat nº G8091) (exemplos 20 e 45). A exposição à fosfatidilserina e a morte celular pode ser determinada usando-se kits especiais para este propósito, tais como o Kit I de Detecção da Apoptose FITC Anexina V da BD Pharmingen (Cat nº 556547) (exemplos 19 e 25).

[00213] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 e o dito anticorpo anti-DR5 induz a exposição de fosfatidilserina (PS), que pode ser medida pela ligação de Anexina-V. Em uma modalidade da presente invenção anti-DR5 induz a translocação de PS para a superfície da célula da célula alvo. Portanto, ligação de Anexina-V correlaciona-se com a morte celular programada e pode ser usada para medir a capacidade do anticorpo anti-DR5 para induzir eventos celulares levando à morte celular programada.

[00214] Em uma modalidade preferida o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 que induz apoptose em uma célula alvo expressando DR5, tal como uma célula de tumor.

[00215] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 que reduz a viabilidade celular.

[00216] Em uma modalidade o anticorpo é um anticorpo anti-DR5 que induz agrupamento de DR5. Que o anticorpo pode induzir agrupamento e ainda realçar o agrupamento leva à ativação de pelo menos os mesmos caminhos de sinalização intracelular como TRAIL ligado ao DR5.

[00217] Em uma modalidade, as composições da presente invenção compreendem um anticorpo anti-DR5 e induzem, deflagram, aumentam ou realçam a apoptose ou morte celular nas células cancerosas ou tecidos cancerosos expressando DR5. A apoptose ou morte celular aumentada ou realçada pode ser medida por um nível aumentado ou realçado de exposição de fosfatidilserina nas células expostas aos ou tratadas com um ou mais anticorpos anti-DR5 da invenção. Alternativamente, a apoptose ou morte celular aumentada ou realçada pode ser medida medindo-se a ativação de caspase 3 ou caspase 7 nas células que foram expostas a ou tratadas com um ou mais anticorpos anti-DR5 da invenção. Alternativamente, a apoptose ou morte celular aumentada ou realçada pode ser medida por uma perda de viabilidade nas culturas celulares que foram expostas aos ou tratadas com um ou mais anticorpos anti-DR5 da invenção, comparadas com culturas celulares não tratadas. A indução da apoptose mediada pela caspase pode ser avaliada demonstrando-se a inibição da perda de viabilidade depois da exposição ao anticorpo DR5 por um inibidor da caspase, por exemplo ZVAD.

[00218] Em uma modalidade da presente invenção, o anticorpo em uma composição farmacêutica da invenção é um anticorpo anti-DR5 que se envolve na oligomerização tal como hexamerização de anticorpos nas células alvos expressando DR5. A oligomerização tal como a hexamerização é mediada através das interações Fc-Fc. Um método para determinar isto é pela inibição das interações Fc-Fc que indicam que anticorpos oligomerizam por exemplo hexamerizam. As interações Fc-Fc podem ser inibidas por uma ligação peptídica ao fragmento hidrofóbico envolvido nas interações Fc-Fc tal como DCAWHLGELVWCT como descrito no exemplo 15.

[00219] Os anticorpos a serem formulados em uma composição farmacêutica da invenção podem ser produzidos recombinantemente em uma célula hospedeira pela introdução de um vetor de expressão carreando sequências codificando as cadeias de anticorpo. Um vetor de expressão no contexto da presente invenção pode ser qualquer vetor adequado, incluindo vetores de ácido nucleico cromossômicos, não cromossômicos e sintéticos (uma sequência de ácido nucleico compreendendo um conjunto adequado de elementos de controle de expressão). Os exemplos de tais vetores incluem derivados de SV40, plasmídeos bacterianos, DNA de fago, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados das combinações de plasmídeos e DNA de fago e vetores de ácido nucleico viral (RNA ou DNA). Em uma modalidade, um ácido nucleico codificando anticorpo CD3 humanizado é compreendido em um vetor de DNA ou RNA nu, incluindo, por exemplo, um elemento de expressão linear (como descrito por exemplo em Sykes e Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), um vetor de ácido nucleico compactado (como descrito por exemplo na US 6.077.835 e/ou WO 00/70087), um vetor plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 ou pUC 118/119, um vetor de ácido nucleico de tamanho minimamente “minúsculo” (como descrito por exemplo em Schakowski *et al*., Mol Ther 3, 793-800 (2001)) ou como um construto de vetor de ácido nucleico precipitado, tal como um construto precipitado por $CaPO_4^-$ (como descrito por exemplo na WO 00/46147, Benvenisty e Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler *et al*., Cell 14, 725 (1978) e Coraro e Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Tais vetores de ácido nucleico e o uso dos mesmos são bem conhecidos na técnica (ver por exemplo a US 5.589.466 e US 5.973.972).

[00220] Um ácido nucleico e/ou vetor também podem compreender uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de secreção/localização, que pode alvejar um polipeptídeo, tal como uma cadeia de polipeptídeo nascente, ao espaço periplásmico ou dentro do meio de

cultura de célula. Tais sequências são conhecidas na técnica e incluem peptídeos líderes de secreção ou de sinal, sequências alvejadoras de organela (por exemplo, sequências de localização nuclear, sinais de retenção de ER, sequências de trânsito mitocondrial, sequências de trânsito de cloroplasto), sequências de localização de membrana/âncoras (por exemplo, sequências de parada de transferência, sequências âncoras de GPI) e similares.

[00221] Em um vetor de expressão da invenção, ácidos nucleicos codificando anticorpo e o primeiro e o segundo ácidos nucleicos polipeptídicos podem compreender ou estar associados com qualquer promotor, realçador e outros elementos facilitadores de expressão adequados. Os exemplos de tais elementos incluem promotores de expressão fortes (por exemplo, promotor/realçador IE de CMV humano assim como promotores LTR do RSV, SV40, SL3-3, MMTV e HIV), sequências de terminação poli (A) eficazes, uma origem de replicação para produto plasmídico na *E. coli*, um gene de resistência a antibiótico como marcador selecionável e/ou um sítio de clonagem conveniente (por exemplo, um poliligador). Os ácidos nucleicos também podem compreender um promotor induzível como oposto a um promotor constitutivo tal como IE do CMV (o técnico habilitado reconhecerá que tais termos são de fato descritores de um grau de expressão de gene sob certas condições).

[00222] Os anticorpos podem ser produzidos pelo uso de células hospedeiras recombinantes eucarióticas ou procarióticas. Os exemplos de células hospedeiras incluem células de levedura, bacteriana e de mamífero, tais como células CHO ou HEK-293. Por exemplo, a célula hospedeira pode compreender um ácido nucleico estavelmente integrado dentro do genoma celular que compreende uma sequência codificando a expressão de um anticorpo aqui descrito. A célula hospedeira pode compreender um ácido nucleico estavelmente integrado dentro do genoma celular que compreende uma sequência codificando a expressão de um primeiro ou um segundo

polipeptídeo aqui descrito. Alternativamente, a célula hospedeira pode compreender um ácido nucleico não integrado, tal como um plasmídeo, cosmídeo, fagomídeo ou elemento de expressão linear, que compreenda uma sequência codificando a expressão de um anticorpo aqui descrito.

Anticorpos biespecíficos formulados na composição farmacêutica da invenção

[00223] Em um outro aspecto, a composição farmacêutica da presente invenção compreende um anticorpo biespecífico compreendendo pelo menos uma região de ligação a antígeno que se liga ao DR5 humano, como aqui descrito.

[00224] Em um outro aspecto, a composição farmacêutica da presente invenção compreende um anticorpo biespecífico compreendendo uma ou mais regiões de ligação a antígeno que se ligam ao DR5 humano, como aqui descrito.

[00225] Em uma modalidade disto, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira região de ligação a antígeno e uma segunda região de ligação a antígeno que se ligam ao DR5 humano, como aqui definido.

[00226] Em uma tal modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno ligam epítopos diferentes no DR5 humano.

[00227] Em uma outra modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno ligando ao DR5 humano não bloqueia a ligação da dita segunda região de ligação a antígeno ligando ao DR5 humano.

[00228] Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região Fc, em que a primeira e/ou segunda região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma

posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU de acordo com a invenção. Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região Fc, em que a primeira e segunda região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU. Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região Fc, em que a primeira região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU. Em uma modalidade, o anticorpo anti-DR5 biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região Fc, em que a segunda região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU.

[00229] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem, c) as seis sequências da CDR definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

[00230] Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as

propriedades agonísticas, a ligação do epítopo DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações ou substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações ou substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma das mutações ou substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações ou substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00231] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem, b) as seis sequências da CDR definidas em (a) compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas seis sequências da CDR de cada uma da primeira e segunda região de ligação a antígeno respectivamente.

[00232] Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a

capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituição é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00233] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NO: s 13, RTS, 14 ou em que a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem, c) as seis sequências da CDR definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

[00234] Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a Ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações ou substituições no total são permitidas

através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações ou substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma das mutações ou substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações ou substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00235] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno em que a) a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR(VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NO: s 13, RTS, 14 ou em que a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem b) as seis sequências da CDR definidas em (uma tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR de cada região de ligação a antígeno respectivamente. Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações por exemplo substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras

modalidades nenhuma das mutações ou substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00236] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem,

c) as seis sequências da CDR definidas em a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR.

[00237] Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações ou substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações ou substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma das mutações ou substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações

ou substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00238] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que,

a) a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou

b) a dita primeira região de ligação a antígeno e a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem as seis sequências da CDR definidas em a) compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas seis sequências da CDR de cada região de ligação a antígeno.

[00239] Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR de cada região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações por exemplo substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituição é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00240] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (a) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 8, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 ou b) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR e em que a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (c) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (d) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (C) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR.

[00241] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que (a) a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 8, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou b) a dita primeira região de ligação a antígeno ou a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR de cada região de ligação a antígeno.

[00242] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (a) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 ou (b) a (VH)

CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR e em que a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (c) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (d) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (C) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR.

[00243] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que (a) a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou b) a dita primeira região de ligação a antígeno ou a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR de cada região de ligação a antígeno.

[00244] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (a) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 16, CDR2 SEQ ID NO: 17, CDR3 SEQ ID NO: 18 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO: 22, ou (b) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR e em que a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (c) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2

RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (d) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (C) acima tendo uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR.

[00245] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda região de ligação a antígeno, em que (a) a dita primeira região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (VH) CDR1 SEQ ID NO: 16, CDR2 SEQ ID NO: 17, CDR3 SEQ ID NO: 18 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO: 22 e a dita segunda região de ligação a antígeno compreende as seguintes sequências (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou b) a dita primeira região de ligação a antígeno ou a dita segunda região de ligação a antígeno compreendem uma a cinco mutações no total através das ditas seis sequências da CDR de cada região de ligação a antígeno.

[00246] Se o anticorpo é um anticorpo biespecífico que compreende uma região Fc compreendendo uma primeira e uma segunda cadeia pesada, uma mutação de acordo com a presente invenção isto é uma mutação em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1, na numeração EU, pode em princípio estar presente apenas em uma das cadeias pesadas; isto é na primeira ou segunda cadeia pesada, embora em uma modalidade preferida de acordo com a presente invenção, a mutação está presente tanto na primeira quanto na segunda cadeia pesada do anticorpo biespecífico.

[00247] Em uma modalidade particular o anticorpo pode ser anticorpo biespecífico tal como a proteína heterodimérica descrita na WO 11/131746, que é por meio deste aqui incorporada por referência.

[00248] Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo biespecífico que compreende uma primeira cadeia pesada compreendendo uma primeira região Fc de uma imunoglobulina e uma primeira região de ligação de antígeno e uma segunda cadeia pesada compreendendo uma segunda região

Fc de uma imunoglobulina e uma segunda região de ligação de antígeno, em que a primeira e segunda regiões de ligação de antígeno ligam epítopos diferentes no mesmo antígeno ou em antígenos diferentes.

[00249] Em uma modalidade adicional a dita primeira cadeia pesada compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição de aminoácido adicional em uma posição selecionada daquela correspondendo a K409, T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 na região Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humana; e em que a dita segunda cadeia pesada compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição de aminoácido adicional em uma posição selecionada daquela correspondendo a F405, T366, L368, K370, D399, Y407 e K409 na região Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humana e em que a dita substituição de aminoácido adicional na primeira cadeia pesada compreendendo uma primeira região Fc é diferente da dita substituição de aminoácido adicional na segunda cadeia pesada compreendendo uma segunda região Fc.

[00250] Em uma modalidade adicional a dita primeira cadeia pesada compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição de aminoácido em uma posição correspondendo a K409 na região Fc de uma cadeia pesada da IgG1 humana; e a dita segunda cadeia pesada compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição de aminoácido em uma posição correspondendo a F405 na região Fc de uma cadeia pesada da IgG1 humana.

[00251] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende introduzir uma primeira e segunda regiões Fc compreendendo uma mutação em pelo menos um resíduo de aminoácido selecionada daqueles correspondendo a E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436 e K447 na região Fc de uma cadeia pesada da IgG1 humana, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W.

[00252] Em uma modalidade adicional a mutação na primeira e

segunda região Fc em pelo menos um resíduo de aminoácido selecionado daqueles correspondendo a E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436 e K447 na região Fc de uma cadeia pesada da IgG1 humana, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W, pode estar na mesma posição do resíduo de aminoácido ou uma posição diferente. Em uma modalidade adicional a mesma pode ser a mesma mutação ou uma diferente na mesma posição de resíduo de aminoácido na primeira e segunda regiões Fc.

[00253] Em uma outra modalidade o anticorpo biespecífico compreende uma primeira ou segunda regiões CH2-CH3 compreendendo uma mutação em pelo menos um resíduo de aminoácido selecionado daqueles correspondendo a E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436 e K447 na região Fc de uma cadeia pesada da IgG1 humana, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W.

[00254] Em uma modalidade, o anticorpo biespecífico compreende uma primeira e uma segunda cadeia pesada, em que a dita primeira cadeia pesada compreende uma mutação correspondendo a F405L na IgG1 humana de acordo com a numeração EU e a dita segunda cadeia pesada compreende uma mutação correspondendo a K409R na IgG1 humana de acordo com a numeração EU.

Composições da invenção compreendendo dois ou mais anticorpos

[00255] Em um aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo dois ou mais anticorpos, em que pelo menos um dos anticorpos é um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU.

[00256] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreendendo dois ou mais anticorpos, em que pelo menos um dos

anticorpos é um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W.

[00257] Em uma modalidade adicional, a composição farmacêutica da invenção compreende dois anticorpos diferentes em que ambos os anticorpos compreendem uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU.

[00258] Em uma modalidade adicional, a composição farmacêutica da invenção compreende dois anticorpos diferentes em que ambos os anticorpos compreendem uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W.

[00259] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 e um segundo anticorpo anti-DR5 como aqui descritos. Isto é, em uma modalidade da presente invenção a composição compreende um primeiro anticorpo como aqui descrito e um segundo anticorpo como aqui descrito, em que o primeiro e o segundo anticorpo não são idênticos.

[00260] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e compreendendo uma mutação na primeira região Fc na posição correspondendo a E430 na IgG1 humana, na numeração EU e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc e compreendendo

uma mutação na segunda região Fc na posição correspondendo a E430 na IgG1 humana, na numeração EU, em que o primeiro e segundo anticorpos ligam epítopos diferentes no DR5.

[00261] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e compreendendo uma mutação na primeira região Fc na posição correspondendo a E430 na IgG1 humana, na numeração EU e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc e compreendendo uma mutação na segunda região Fc na posição correspondendo a E430 na IgG1 humana, na numeração EU, em que o primeiro anticorpo não bloqueia a ligação do segundo anticorpo ao DR5. O bloqueio de um anticorpo anti-DR5 por um outro anticorpo anti-DR5 pode ser determinado em um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) em sanduíche como descrito no Exemplo 7. Em resumo, o bloqueio cruzado pelos anticorpos anti-DR5 pode ser determinado pelas seguintes etapas, a) 2 µg/ml de um primeiro anticorpo anti-DR5 é revestido em uma placa de ELISA de fundo chato de 96 poços seguido por b) bloqueio com PBSA e lavagem da placa em PBST seguido por c) incubação da placa com 0,2 µg/ml de DR5EDCD-FcHistag e 1 µg/ml de um segundo anticorpo anti-DR5 seguido por d) lavagem em PBST e incubação da placa com um anticorpo antietiqueta His seguido por e) lavagem da placa e incubação da placa com poli-HRP seguido por f) incubação da placa com 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) seguido por g) interrupção da reação do substrato pela adição de 2% de ácido oxálico seguido por h) medição da fluorescência a 405 nm em uma leitora ELISA. Se um anticorpo anti-DR5 bloqueia a ligação ao DR5 por um outro anticorpo anti-DR5 pode ser calculado pela seguinte fórmula (% de inibição = 100 – [(ligação na presença de anticorpo/ligação de competição na ausência de anticorpo competidor)]*100).

[00262] Em uma modalidade da presente invenção a composição

farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5 tendo uma primeira e segunda regiões Fc compreendendo uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E430 na IgG1 humana, na numeração EU, uma tal mutação pode ser selecionada do grupo consistindo em: E430G, E430S e E430T.

[00263] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e compreendendo uma mutação E430G e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc e compreendendo uma mutação E430G, em que o primeiro e segundo anticorpos ligam epítopos diferentes no DR5. O epítopo ou região de ligação no domínio extracelular no DR5 humano dos anticorpos da presente invenção podem ser determinados pelo uso do método de moléculas de DR5 trocadas no domínio como descrito no Exemplo 6. Em resumo, as moléculas de DR5 trocadas no domínio são transitoriamente expressas em células CHO, a ligação de anticorpos às moléculas de DR5 humano trocadas no volume é determinada por um ensaio FACS. A perda de ligação às moléculas de DR5 humano trocadas no volume indica que o domínio trocado de DR5 humano contém um ou mais aminoácidos que estão envolvidos na ligação ao anticorpo.

[00264] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e

o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR:

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

preferivelmente em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação na primeira e segunda regiões Fc na posição correspondendo a E430 na IgG1 humana.

[00265] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e

o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR:

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação E430G na primeira e segunda regiões Fc.

[00266] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e

o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 preferivelmente compreendem uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E430 na IgG1 humana.

[00267] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação E430G na primeira e segunda regiões Fc.

[00268] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma região Fc e compreendendo uma mutação na região Fc em uma posição correspondendo a E345 na IgG1 humana, na numeração EU e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma região Fc e compreendendo uma mutação na região Fc em uma posição correspondendo a E345 na IgG1 humana, na numeração EU, em que o primeiro e segundo anticorpos ligam epítopos diferentes no DR5.

[00269] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma região Fc e compreendendo uma mutação na região Fc em uma posição correspondendo a E345 na IgG1 humana, na numeração EU e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma região Fc e compreendendo uma mutação na posição correspondendo à E345 na IgG1 humana, na numeração EU, em que o primeiro anticorpo não bloqueia a ligação do segundo anticorpo ao DR5.

[00270] Em uma modalidade da presente invenção a composição

farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5 tendo uma primeira e segunda regiões Fc e compreendendo uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E345, uma tal mutação pode ser selecionada do grupo consistindo em: E345K, E345Q, E345R e E345Y.

[00271] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e compreendendo um E345K e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc e compreendendo uma mutação E345K, em que o primeiro e segundo anticorpos ligam epítopos diferentes no DR5.

[00272] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E345 na IgG1 humana.

[00273] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs:

13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E345 na IgG1 humana, na numeração EU.

[00274] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação E345K na primeira e segunda regiões Fc.

[00275] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação E345K na primeira e segunda regiões Fc.

[00276] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda

região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E345.

[00277] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a E345 na IgG1 humana, na numeração EU.

[00278] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13,

RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação E345K na primeira e segunda regiões Fc.

[00279] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação E345K na primeira e segunda regiões Fc.

[00280] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5 tendo uma primeira e segunda regiões Fc e compreendendo uma mutação na primeira e segunda regiões Fc em uma posição correspondendo a S440 na IgG1 humana, na numeração EU, uma tal mutação pode ser selecionada do grupo consistindo em: S440W e S440Y.

[00281] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação S440Y na primeira e segunda regiões Fc.

[00282] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 e em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 e o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreendem uma mutação S440Y na primeira e segunda regiões Fc.

[00283] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 tendo uma primeira região Fc e um segundo anticorpo anti-DR5 tendo uma segunda região Fc em que o primeiro e o segundo anticorpos compreendem uma mutação inibidora de hexamerização adicional na primeira e segunda regiões Fc correspondendo a K439E ou S440K na IgG1 humana na numeração EU. Em uma modalidade da presente invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5 tendo uma primeira e segunda regiões Fc, em que o primeiro e segundo anticorpos anti-DR5 compreendem uma mutação realçadora de hexamerização na primeira e segunda regiões Fc em uma posição de aminoácido correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU e em que o primeiro anticorpo compreende uma mutação adicional em um aminoácido em uma posição correspondendo a K439 e em que o segundo anticorpo compreende uma mutação adicional em um aminoácido em uma posição correspondendo a S440, com a condição de que a mutação realçadora de hexamerização não esteja em S440 quando a mutação adicional está em S440. Isto é, em uma modalidade da presente invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende uma mutação

realçadora de hexamerização tal como E430G e K439E e em que o segundo anticorpo anti-DR5 compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como E430G e S440K. Isto é, em uma modalidade da presente invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o primeiro anticorpo anti-DR5 compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como E345K e K439E e em que o segundo anticorpo anti-DR5 compreende uma mutação realçadora de hexamerização tal como E345K e S440K. Por meio deste são providas modalidades que permitem que composições em que a hexamerização exclusivamente ocorre entre as combinações de anticorpos compreendendo uma mutação K439E e anticorpos compreendendo uma mutação S440K.

[00284] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende epítopos de ligação de um primeiro anticorpo anti-DR5 e um segundo anticorpo anti-DR5 diferentes no DR5 humano. Em uma modalidade da presente invenção a composição compreende um primeiro anticorpo anti-DR5 compreendendo uma região de ligação a antígeno que se liga a um epítopo no DR5 compreendendo ou requerendo um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 116 a 138 e um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 139 a 166 da SEQ ID NO: 46 e um segundo anticorpo anti-DR5 compreendendo uma região de ligação a antígeno que se liga a um epítopo no DR5 compreendendo ou requerendo um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 79 a 138 da SEQ ID NO: 46.

[00285] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreendo a dita primeira ligação do anticorpo anti-DR5 ao DR5, que não bloqueia a ligação do dito segundo anticorpo anti-DR5 ao DR5. Isto é, em uma modalidade da invenção a composição compreende uma primeira ligação de anticorpo anti-DR5 ao DR5 e uma segunda ligação de anticorpo anti-DR5 ao DR5, em que o primeiro e o segundo anticorpos anti-

DR5 não competem quanto à ligação ao DR5. Assim deve ser entendido no contexto da presente invenção que um primeiro anticorpo anti-DR5 que não bloqueia a ligação de um segundo anticorpo anti-DR5 pode ser o mesmo como um primeiro anticorpo anti-DR5 que não compete com um segundo anticorpo anti-DR5.

[00286] Em uma modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende uma região VH e uma região VL compreendendo seis sequências da CDR, em que as seis sequências da CDR no total têm pelo menos 75%, 80% , 85 %, 90%, 95%, 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências CDR como apresentadas no seguinte: a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6; e o dito segundo anticorpo compreende uma região VH e uma região VL compreendendo seis sequências da CDR, em que as seis sequências da CDR no total têm pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências de CDR como apresentadas no seguinte; b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[00287] Em uma modalidade da mesma a identidade de sequência das seis sequências da CDR no total do dito primeiro anticorpo e do dito segundo anticorpo é pelo menos 85 %, 90 %, 95%, 97% ou 99%.

[00288] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo

compreende,

c) as seis sequências da CDR definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

[00289] Isto é a um ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações ou substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações ou substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma das mutações ou substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações ou substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00290] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que

a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que

b) o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem as seis sequências da CDR de cada anticorpo definidas em (a) ou compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

[00291] Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituição é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00292] Em uma modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende uma região VH e uma região VL compreendendo seis sequências da CDR, em que as seis sequências da CDR no total têm pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências de CDR como apresentadas no seguinte: a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS; e o dito segundo anticorpo compreende uma região VH e uma região VL compreendendo seis sequências da CDR, em que as seis sequências da CDR no total têm pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências da CDR como apresentadas no seguinte; b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[00293] Em uma modalidade da mesma a identidade de sequência das seis sequências da CDR no total do dito primeiro anticorpo e do dito segundo

anticorpo é pelo menos 85 %, 90 %, 95%, 97% ou 99%.

[00294] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que

a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR, (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que

b) o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem as seis sequências da CDR definidas em a) tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

[00295] Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações ou substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações ou substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma das mutações ou substituições é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações ou substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00296] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que

a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que b) o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem as seis sequências da CDR de cada anticorpo definidas em (a) ou compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente. Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituição é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00297] Em uma modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende uma região VH e uma região VL compreendendo seis sequências da CDR, em que as seis sequências da CDR no total têm pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências de CDR como apresentadas no seguinte: a) (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ

ID NOs: 21, GAS, 6; e o dito segundo anticorpo compreende uma região VH e uma região VL compreendendo seis sequências da CDR, em que as seis sequências da CDR no total têm pelo menos 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 97% ou pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácidos com as sequências de CDR como apresentado no seguinte; b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

[00298] Em uma modalidade da mesma a identidade de sequência das seis sequências da CDR no total do dito primeiro anticorpo e do dito segundo anticorpo é pelo menos 85 %, 90 %, 95%, 97% ou 99%.

[00299] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que

a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14 ou em que b) o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem as seis sequências da CDR de cada anticorpo definidas em (a) ou compreendem uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente. Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5. Isto é, em uma modalidade até cinco mutações por exemplo substituições no total são permitidas através das seis CDRs compreendendo a região de ligação a antígeno. Em algumas modalidades da invenção até cinco mutações por exemplo substituições tais como uma, duas, três, quatro ou cinco mutações ou substituições, são feitas através das três

CDRs da região VH e nenhuma mutação é feita através das CDRs da região VL. Em outras modalidades nenhuma mutação por exemplo substituição é feita através das CDRs da região VH mas até cinco mutações por exemplo substituições, tais como uma, duas, três, quatro ou cinco são encontradas através das CDRs da região VL.

[00300] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5 como definido em qualquer uma das modalidades acima em que o dito primeiro e segundo anticorpos compreendem ainda uma mutação na região Fc correspondendo à posição K439 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro anticorpo compreendendo uma mutação correspondendo a K439 tal como K439E e um segundo anticorpo compreendendo uma mutação correspondendo a S440 tal como S440K. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro anticorpo compreendendo uma mutação correspondendo a S440 tal como S440K e um segundo anticorpo compreendendo uma mutação correspondendo a K439 tal como K439E. Por meio desta modalidade são providos em que a composição compreende um primeiro anticorpo compreendendo pelo menos duas mutações tais como E430G e K439E e um segundo anticorpo compreendendo pelo menos duas mutações tais como E430G e S440K. Em uma outra modalidade da presente invenção a composição compreende um primeiro anticorpo compreendendo pelo menos duas mutações tais como E345K e K439E e um segundo anticorpo compreendendo pelo menos duas mutações tais como E345K e S440K. Por meio deste são providas modalidades que permitem a hexamerização de anticorpos com diferentes especificidades.

[00301] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes sequências (a)

(VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 8, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes sequências (b) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (c) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR. Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

[00302] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro e segundo anticorpos compreendem as seguintes sequências de CDR (a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes sequências de CDR (VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 8, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes sequências de CDR (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (b) as sequências de CDR descritas em (a) para cada anticorpo compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas sequências de CDR para cada anticorpo. Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

[00303] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes sequências (a) (VH) CDR1 SEQ ID NOs 1, CDR2 2, CDR3 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NOs 5, CDR2 FAS, CDR3 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes sequências (b) (VH) CDR1 SEQ ID NOs 10, CDR2 2, CDR3 11 e (VL) SEQ ID NOs CDR1 13, CDR2 RTS, CDR3 14 ou (c) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR. Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

[00304] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro e segundo anticorpos compreendem as seguintes sequências de CDR (a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes sequências de CDR (VH) CDR1 SEQ ID NO: 1, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 3 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO: 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes sequências de CDR (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (b) as sequências de CDR descritas em (a) para cada anticorpo compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas sequências de CDR para cada anticorpo. Isto é a uma ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a

ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

[00305] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes sequências (a) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 16, CDR2 SEQ ID NO: 17, CDR3 SEQ ID NO: 18 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO: 22 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes sequências (b) (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (c) a (VH) CDR1, CDR2 e CDR3 e (VL) CDR1, CDR2 e CDR3 como definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR. Isto é a uma ou mais mutações ou substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

[00306] Em uma modalidade da presente invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro e segundo anticorpos compreendem as seguintes sequências de CDR (a) o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes sequências de CDR (VH) CDR1 SEQ ID NO: 16, CDR2 SEQ ID NO: 17, CDR3 SEQ ID NO: 18 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO: 22 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes sequências de CDR (VH) CDR1 SEQ ID NO: 10, CDR2 SEQ ID NO: 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 e (VL) CDR1 SEQ ID NO: 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO: 14 ou (b) as sequências de CDR descritas em (a) para cada anticorpo compreendendo uma a cinco mutações por exemplo substituições no total através das ditas sequências de CDR para cada anticorpo. Isto é a um

ou mais mutações por exemplo substituições através das seis sequências da CDR da região de ligação a antígeno não mudam as características de ligação do dito primeiro ou segundo anticorpos tais como as propriedades agonísticas, a ligação epitópica de DR5 e/ou a capacidade para induzir apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

[00307] Em uma modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos em que ambos anticorpos compreendem uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, na numeração EU, em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de 1:49 a 49:1, tal como razão molar de 1:1, uma razão molar de 1:2, uma razão molar de 1:3, uma razão molar de 1:4, uma razão molar de 1:5, uma razão molar de 1:6, uma razão molar de 1:7, uma razão molar de 1:8, uma razão molar de 1:9, uma razão molar de 1:10, uma razão molar de 1:15, uma razão molar de 1:20, uma razão molar de 1:25, uma razão molar de 1:30, uma razão molar de 1:35, uma razão molar de 1:40, uma razão molar de 1:45, uma razão molar de 1:50, uma razão molar de 50:1, uma razão molar de 45:1, uma razão molar de 40:1, uma razão molar de 35:1, uma razão molar de 30:1 razão molar um 25:1, uma razão molar de 20:1, uma razão molar de 15:1, uma razão molar de 10:1, uma razão molar de 9:1, uma razão molar de 8:1, uma razão molar de 7:1, uma razão molar de 6:1, uma razão molar de 5:1, uma razão molar de 4:1, uma razão molar de 3:1, uma razão molar de 2:1.

[00308] Em uma modalidade da invenção, a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos em que ambos anticorpos compreendem uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1

humana, na numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W, em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de 1:49 a 49:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:1, uma razão molar de cerca de 1:2, uma razão molar de cerca de 1:3, uma razão molar de cerca de 1:4, uma razão molar de cerca de 1:5, uma razão molar de cerca de 1:6, uma razão molar de cerca de 1:7, uma razão molar de cerca de 1:8, uma razão molar de cerca de 1:9, uma razão molar de cerca de 1:10, uma razão molar de cerca de 1:15, uma razão molar de cerca de 1:20, uma razão molar de cerca de 1:25, uma razão molar de cerca de 1:30, uma razão molar de cerca de 1:35, uma razão molar de cerca de 1:40, uma razão molar de cerca de 1:45, cerca de um 1:50 razão molar, cerca de um 50:1 razão molar, uma razão molar de cerca de 45:1, uma razão molar de cerca de 40:1, uma razão molar de cerca de 35:1, uma razão molar de cerca de 30:1, uma razão molar de cerca de 25:1, uma razão molar de cerca de 20:1, uma razão molar de cerca de 15:1, uma razão molar de cerca de 10:1, uma razão molar de cerca de 9:1, uma razão molar de cerca de 8:1, uma razão molar de cerca de 7:1, uma razão molar de cerca de 6:1, uma razão molar de cerca de 5:1, uma razão molar de cerca de 4:1, uma razão molar de cerca de 3:1, uma razão molar de cerca de 2:1.

[00309] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de 1:9 a 9:1.

[00310] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição a cerca de uma razão molar de 1:9 a 9:1.

[00311] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro

anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição a cerca de uma razão molar de 1:4 a 4:1, tal como cerca de uma razão molar de 1:3 a 3:1, tal como cerca de uma razão molar de 1:2 a 2:1.

[00312] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em aproximadamente uma razão molar de 1:1.

[00313] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de 1:1.

[00314] Em uma modalidade preferida da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo e segundo anticorpo e/ou quaisquer anticorpos adicionais estão presentes na composição em uma razão equimolar.

[00315] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 5 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 5 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 5 mg/ml de um primeiro anticorpo, 5 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00316] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 10 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 10 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de

sódio em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 10 mg/ml do dito primeiro anticorpo, 10 mg/ml do dito segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00317] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 15 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 15 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 15 mg/ml de um primeiro anticorpo, 15 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00318] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 20 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 20 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 20 mg/ml de um primeiro anticorpo, 20 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00319] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 30 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 30 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 30 mg/ml de um primeiro anticorpo, 30 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no

pH 6,0.

[00320] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 40 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 40 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 40 mg/ml de um primeiro anticorpo, 40 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00321] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro anticorpo está presente na composição a 50 mg/ml e o dito segundo anticorpo está presente na composição a 50 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 50 mg/ml de um primeiro anticorpo, 50 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00322] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro e segundo anticorpos está presente na composição em uma total anticorpo concentração de 10 mg/ml de anticorpo e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos em uma concentração total de anticorpo de 10 mg/ml de anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00323] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica

compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro e segundo anticorpos está presente na composição em uma total anticorpo concentração de 20 mg/ml de anticorpo e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos em uma concentração total de anticorpo de 20 mg/ml de anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00324] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro e segundo anticorpos está presente na composição em uma concentração total de anticorpo de 30 mg/ml de anticorpo e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos em uma concentração total de anticorpo de 30 mg/ml de anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00325] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro e segundo anticorpos está presente na composição em uma concentração total de anticorpo de 40 mg/ml de anticorpo e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos em uma concentração total de anticorpo de 40 mg/ml de anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00326] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o dito primeiro e segundo anticorpos está presente na composição em uma concentração total

de anticorpo de 50 mg/ml de anticorpo e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende um primeiro e um segundo anticorpos em uma concentração total de anticorpo de 50 mg/ml de anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00327] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um anticorpo anti-DR5, o anticorpo anti-DR5 compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 39 e em que a HC compreende uma das sequências selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 33;

b) (HC) SEQ ID NO: 34;

c) (HC) SEQ ID NO: 35;

d) (HC) SEQ ID NO: 36;

e) (HC) SEQ ID NO: 37; ou

f) (HC) SEQ ID NO: 38,

em que o dito anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 mg/ml a 200 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 10 mg/ml de anticorpo anti-DR5, 5 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00328] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um anticorpo anti-DR5, o anticorpo anti-DR5 compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 43 e em que a HC compreende uma das sequências selecionadas do grupo consistindo em:

a) (HC) SEQ ID NO: 40;

b) (HC) SEQ ID NO: 41; ou

c) (HC) SEQ ID NO: 42,

em que o dito anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 mg/ml a 200 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 10 mg/ml de anticorpo anti-DR5, 5 mg/ml de um segundo anticorpo, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00329] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende uma sequência HC selecionada do grupo consistindo em a) SEQ ID NO: 33; b) SEQ ID NO: 34; c) SEQ ID NO: 35; d) SEQ ID NO: 36; e) SEQ ID NO: 37; ou f) SEQ ID NO: 38 e a sequência LC a SEQ ID NO: 39, o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende uma sequência HC selecionada do grupo consistindo em g) SEQ ID NO: 40; h) SEQ ID NO: 41; ou i) SEQ ID NO: 42 e a sequência LC a SEQ ID NO: 43, o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 mg/ml a 200 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 mg/ml a 200 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 10 mg/ml de um primeiro anticorpo anti-DR5, 10 mg/ml de um segundo anticorpo anti-DR5, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00330] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende a sequência HC SEQ ID NO: 38 e a sequência LC SEQ ID NO: 39, o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende a sequência HC da SEQ ID NO: 42 e a sequência LC a SEQ ID

NO: 43, o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 mg/ml a 200 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 2 mg/ml a 200 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5. Em uma modalidade da invenção a composição compreende 10 mg/ml de um primeiro anticorpo anti-DR5, 10 mg/ml de um segundo anticorpo anti-DR5, 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6,0.

[00331] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende HC SEQ ID NO: 38 e LC SEQ ID NO: 39, o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende HC SEQ ID NO: 42 e LC SEQ ID NO: 43, o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 10 mg/ml a 20 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição de 10 mg/ml a 20 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5.

[00332] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende HC SEQ ID NO: 38 e LC SEQ ID NO: 39, o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende HC SEQ ID NO: 42 e LC SEQ ID NO: 43, o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 10 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 10 mg/ml e em que a composição compreende ainda de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio em um pH entre 5,5 e 6,5.

[00333] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreende um primeiro e um segundo anticorpos anti-DR5, em que o dito primeiro anticorpo anti-DR5 compreende HC SEQ ID NO: 38 e LC SEQ ID

NO: 39, o dito segundo anticorpo anti-DR5 compreende HC SEQ ID NO: 42 e LC SEQ ID NO: 43, o dito primeiro anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 10 mg/ml e o dito segundo anticorpo anti-DR5 está presente na composição a 10 mg/ml e em que a composição compreende ainda 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio no pH 6.

[00334] Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um kit de partes compreendendo duas ou mais composições farmacêuticas de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que as composições são para uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia. Em uma modalidade, as composições são para uso simultâneo em terapia, em que as composições são misturadas imediatamente antes do uso.

[00335] Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um método para preparar uma composição farmacêutica de acordo com a invenção, o dito método compreendendo misturar uma primeira composição farmacêutica compreendendo um primeiro anticorpo como aqui definido com uma segunda composição farmacêutica compreendendo um segundo anticorpo como aqui definido.

Aplicações Terapêuticas

[00336] As composições farmacêuticas de acordo com qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção podem ser usadas como um medicamento, isto é para aplicações médicas, tais como terapêuticas.

[00337] Assim, em um aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção para o uso em um medicamento.

[00338] Em um outro aspecto, a presente invenção provê métodos para tratar ou prevenir um distúrbio, tal como câncer, cujo método compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica da invenção a um sujeito em necessidade da mesma.

[00339] A composição farmacêutica pode ser administrada por qualquer via e modo adequados. As vias adequadas de administrar um

composto da presente invenção *in vivo* e *in vitro* são bem conhecidas na técnica e podem ser selecionadas por aqueles versados na técnica.

[00340] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da presente invenção é administrada parenteralmente. Os termos "administração parenteral" e "parenteralmente administrado" como aqui usados se referem aos modos de administração outros que não a administração enteral e tópica, usualmente por injeção e incluem injeção epidérmica, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, intracraniana, intratorácica, epidural e intraesternal e infusão.

[00341] Em uma modalidade, a composição farmacêutica da presente invenção é administrada pela injeção ou infusão intravenosas ou subcutâneas.

[00342] As composições farmacêuticas de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 podem ser usadas no tratamento ou prevenção de distúrbios envolvendo células expressando DR5. Por exemplo, os anticorpos podem ser administrados aos sujeitos humanos, por exemplo, *in vivo*, para tratar ou prevenir distúrbios envolvendo células expressando DR5. Como aqui usado, o termo "sujeito" é tipicamente um ser humano ao qual o anticorpo anti-DR5 ou anticorpo biespecífico são administrados. Os sujeitos podem por exemplo incluir pacientes humanos tendo distúrbios que possam ser corrigidos ou melhorados pela modulação da função DR5 ou pelo extermínio da célula expressando DR5, direta ou indiretamente.

[00343] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de doença infecciosa, doença autoimune ou anomalias cardiovasculares.

[00344] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição

farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de câncer e/ou tumores. O termo "câncer" se refere a ou descreve a condição fisiológica em mamíferos tais como seres humanos isto é tipicamente distinguido pelo crescimento desregulado. A maioria dos cânceres pertencem a um dos dois grupos maiores de cânceres, isto é, tumores sólidos e tumores hematológicos.

[00345] Em uma modalidade particular, a composição farmacêutica é administrada profilaticamente de modo a reduzir o risco de desenvolver câncer, retardar o início de um evento na progressão de câncer ou reduzir o risco de retorno quando um câncer está em remissão e/ou um tumor primário foi cirurgicamente removido. No último caso, a composição farmacêutica, por exemplo, seria administrada em associação com (isto é, antes, durante ou depois) da cirurgia. A administração profilática também pode ser útil em pacientes onde é difícil localizar um tumor que é acreditado estar presente devido a outros fatores biológicos.

[00346] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de tumores sólidos e/ou tumores hematológicos.

[00347] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de tumores sólidos tais como, câncer colorretal, incluindo carcinoma colorretal e adenocarcinoma colorretal, câncer de bexiga, osteossarcoma, condrossarcoma, câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo-negativo, cânceres do sistema nervoso central, incluindo glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, fibrossarcoma neural, tumores neuroendócrinos, câncer cervical, câncer do endométrio, câncer gástrico, incluindo adenocarcinoma gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer renal, câncer hepático, incluindo carcinoma hepatocelular, câncer

pulmonar, incluindo câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC) e câncer pulmonar de célula pequena (SCLC), câncer ovariano, câncer pancreático, incluindo carcinoma dutal pancreático e adenocarcinoma pancreático, sarcoma ou câncer de pele, incluindo melanoma maligno e cânceres de pele não melanoma.

[00348] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de tumores hematológicos tais como, leucemia, incluindo leucemia linfocítica crônica e leucemia mieloide, incluindo leucemia mieloide aguda e leucemia mieloide crônica, linfoma, incluindo linfoma de Não Hodgkin ou mieloma múltiplo, incluindo linfoma de Hodgkin e incluindo síndromes mielodisplásticas.

[00349] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de um câncer selecionado dos seguintes grupos de cânceres; câncer de bexiga, câncer ósseo, câncer colorretal, sarcoma, câncer do endométrio, câncer fibroblástico, câncer gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer renal, leucemia, câncer hepático, câncer pulmonar, linfoma, câncer muscular, câncer de tecido neural, câncer ovariano, câncer pancreático e câncer de pele.

[00350] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso na inibição do crescimento de tumores ou cânceres positivos em DR5 ou expressando DR5.

[00351] Na presente invenção tumores ou cânceres positivos em DR5 devem ser entendidos como células de tumor e/ou células cancerosas expressando DR5 na superfície da célula. Tal expressão de DR5 pode ser detectada pela imuno-histoquímica, citometria de fluxo, imageamento ou outro método de diagnóstico adequado. Os tecidos tumorais e cancerosos que

mostram expressão heterogênea de DR5 também são considerados como tumores e cânceres positivos em DR5.

[00352] Os tumores e/ou cânceres podem expressar DR5 em algumas células e/ou tecidos tumorais e/ou cancerosos mostrando a expressão de DR5, alguns tumores e/ou cânceres podem mostrar superexpressão ou expressão aberrante de DR5, ao passo que outros tumores e/ou cânceres mostram expressão heterogênea de DR5. Tais tumores e/ou cânceres podem ser todos alvos adequados para tratamento com anticorpos anti-DR5, anticorpos biespecíficos e composições compreendendo tais anticorpos de acordo com a presente invenção.

[00353] Em uma modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso na indução de apoptose em tumores expressando DR5.

[00354] Em uma modalidade da invenção, o uso ou o método de tratar um indivíduo tendo um câncer compreendendo administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de composição farmacêutica de acordo com a invenção, compreende ainda administrar um agente terapêutico adicional ao dito indivíduo.

[00355] Em uma modalidade da invenção o agente terapêutico adicional é um agente único ou uma combinação de agentes compreendendo um agente ou regime selecionados do grupo de produtos quimioterapêuticos (incluindo mas não limitados a paclitaxel, temozolomida, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, irinotecano, doxorrubicina, gencitabina, 5-fluorouracila, pemetrexed), inibidores de cinase (incluindo mas não limitados a sorafenib, sunitinib ou everolimus), agentes moduladores de apoptose (incluindo mas não limitados a TRAIL humano recombinante ou birinapant), inibidores de RAS, inibidores de proteassoma (incluindo mas não limitados a bortezomib), inibidores da histona desacetilase (incluindo mas não limitados a

vorinostat), produtos nutracêuticos, citocinas (incluindo mas não limitadas a IFN-γ), anticorpos ou miméticos de anticorpo (incluindo mas não limitados a anticorpos e miméticos de anticorpo anti-TF, anti-AXL, anti-EGFR, anti-IGF-1R, anti-VEGF, anti-CD20, anti-CD38, anti-HER2, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-CD40, anti-CD137, anti-GITR, anti-VISTA (ou outros alvos imunomoduladores)) e conjugados de anticorpo-fármaco tais como brentuximab vedotin, trastuzumab entansina, HuMax-TF-ADC ou HuMax-AXL-ADC.

[00356] Quando da descrição das modalidades da presente invenção, as combinações e permutas de todas as modalidades possíveis não foram explicitamente descritas. Não obstante, o mero fato de que certas medidas são citadas em reivindicações dependentes mutualmente diferentes ou descritas em modalidades diferentes não indica que uma combinação destas medidas não possa ser usada com vantagem. A presente invenção considera todas as combinações e permutas possíveis das modalidades descritas.

Tabela de Sequência 1

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
SEQ ID NO: 1	VH hDR5-01 CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01
SEQ ID NO: 2	VH hDR5-01 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 3	VH hDR5-01 CDR3	VRGLYTYYFDY	
SEQ ID NO: 4	VH hDR5-01	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANGNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSS	
SEQ ID NO: 5	VL hDR5-01 CDR1	QSISNN	
	VL hDR5-01 CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01 CDR3	QQGNSWPYT	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISNN LHWYQQKPGQAPRLLIKFASQSITGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQGNSW PYTFGQGTKLEIK	
SEQ ID NO: 1	VH hDR5-01-G56T CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01-G56T
SEQ ID NO: 8	VH hDR5-01-G56T CDR2	IDPANTNT	
SEQ ID NO: 3	VH hDR5-01-G56T CDR3	VRGLYTYYFDY	
SEQ ID NO: 9	VH hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANTNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSS	
SEQ ID NO: 5	VL hDR5-01-G56T CDR1	QSISNN	
	VL hDR5-01-G56T CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01-G56T CDR3	QQGNSWPYT	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01-G56T	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISNN LHWYQQKPGQAPRLLIKFASQSITGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQGNSW PYTFGQGTKLEIK	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
SEQ ID NO: 10	VH hDR5-05 CDR1	GFNIKDTH	hDR5-05
SEQ ID NO: 2	VH hDR5-05 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 11	VH hDR5-05 CDR3	ARWGTNVYFAY	
SEQ ID NO: 12	VH hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTHMHWVRQAPGQRLEWIGRIDPANGNTEYDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGTNVYFAYWGQGTLVTVSS	
SEQ ID NO: 13	VL hDR5-05 CDR1	SSVSY	
	VL hDR5-05 CDR2	RTS	
SEQ ID NO: 14	VL hDR5-05 CDR3	QQYHSYPPT	
SEQ ID NO: 15	VL hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMYWYQQKPGKAPKPWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 16	VH CONA-CDR1	GGSISSGDYF	Conatumumab IgG1-DR5-CONA
SEQ ID NO: 17	VH CONA-CDR2	IHNSGTT	
SEQ ID NO: 18	VH CONA-CDR3	ARDRGGDYYYGMDV	
SEQ ID NO: 19	VH CONA	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLECIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 20	VH CONA-C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 21	VL CONA-CDR1	QGISRSY	
	VL CONA-CDR2	GAS	
SEQ ID NO: 22	VL CONA-CDR3	QQFGSSPWT	
SEQ ID NO: 23	VL CONA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSILAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK	
SEQ ID NO: 24	DR5 humano	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGARPGPRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQDLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVHKESGTKHSGEVPAVEETVTSSPGTPASPCSLSGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLWKKVLPILKGICSGGGGDPERVDRSSQRPGAEDNVLNEIVSILQPTQVPEQEMEVQEPAEPTGVNMLSPGESEHLLEPAEAERSQRRRLLVPANEGDPTETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLMDNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNKTGRDASVHTLLDALETLGERLAKKIEDHLLSSGKFMILEGNADSAMS	
SEQ ID NO: 25	DR5 de macaco Rhesus	MGQLRQSAPAASGARKGRGPGPREARGARPGLRVLKTLVLVVAAARVLVSADCAPITRQSLDPQRRAAPQQKRSSPTEGLCPPGHHISEDSRDCISCKYGQDYSTHWNDFLFCLRCTKCDSGEVEVNSCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEICRKCRTGCPRGMVKVKDCTPWSDIECVHKESGTKHTGEVPAVEKTVTTSPGTPASPCSLSGIIIGVIVFVVIVVVAVIVWKTSLWKKVLPILKGVCSGDGGDPERVDSSPQRPGAEDNALNEIVSIVQPSQVPEQEMEVQEPAEQTDVNTLSPGESEHLLEPAKAEGPQRRGQLVPVNENDPT	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		ETLRQCFDDFAAIVPFDAWEPLVRQLGLTN NEIKVAKAEAASSRDTLYVMLIKWVNKTG RAASVNTLLDALETLEERLAKQKIQDRLLSS GKFMILEDNADSATS	
SEQ ID NO: 26	DR5 de Murino	MEPPGPSTPTASAAARADHYTPGLRPLPKR RLLYSFALLLAVLQAVFVPVTANPAHNRPA GLQRPEESPSRGPCLAGQILSEGNCKPCREGI DYTSHSNHSLDSCILCTVCKEDKVVETRCNI TTNTVCRCKPGTFEDKDSPEICQSCSNCTDG EEELTSCTPRENRKCVSKTAWASWHKLGL WIGLLVPVVLLIGALLVWKTGAWRQWLLC IKRGCERDPESANSVHSSLLDRQTSSTTNDS NHNTEPGKTQKTGKKLLVPVNGNDSADDL KFIFEYCSDIVPFDSWNRLMRQLGLTDNQIQ MVKAETLVTREALYQMLLKWRHQTGRSAS INHLLDALEAVEERDAMEKIEDYAVKSGRF TYQNAAAQPETGPGGSQCV	
SEQ ID NO: 27	DR5ECD-FcHistag	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGAR PGLRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQ DLAPQQRVAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISED GRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCD SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPE MCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVH KESGTKHSGEAPAVEETVTSSPGTPASPCSP KSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTAPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHHHHHE PEA	
SEQ ID NO: 28	DR5ECDdelHis	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGAR PGPRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQ DLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISED GRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCD SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPE MCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVH KESGHHHHHHHH	
SEQ ID NO: 29	Fc IgG1m(f)	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 30	Fc IgG1m(z)	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 31	Fc IgG1m(a)	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 32	Fc IgG1m(x)	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 33	HC-hDR5-01	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANGNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 34	HC-hDR5-01-E345K	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANGNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 35	HC-hDR5-01-E430G	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANGNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 36	HC-hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANTNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 37	HC-hDR5-01-G56T-E345K	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANTNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 38	HC-hDR5-01-G56T-E430G	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIK DTFIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANTNTKY DPKFQGKATITTDTSSNTAYMELSSLRSEDT AVYYCVRGLYTYYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 39	LC-hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSISNN LHWYQQKPGQAPRLLIKFASQSITGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQGNSW PYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 40	HC-hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIK DTHMHWVRQAPGQRLEWIGRIDPANGNTE YDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGTNVYFAYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 41	HC-hDR5-05-E345K	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIK DTHMHWVRQAPGQRLEWIGRIDPANGNTE YDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGTNVYFAYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 42	HC-hDR5-05-E430G	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIK DTHMHWVRQAPGQRLEWIGRIDPANGNTE YDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGTNVYFAYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 43	LC-hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYM YWYQQKPGKAPKPWIYRTSNLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYHSY PPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 44	DR5 humano, K415N	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGAR PGPRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQ DLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISED GRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCD SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPE MCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVH KESGTKHSGEVPAVEETVTSSPGTPASPCSL SGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLWKKVLP ILKGICSGGGGDPERVDRSSQRPGAEDNVL NEIVSILQPTQVPEQEMEVQEPAEPTGVNML SPGESEHLLEPAEAERSQRRRLLVPANEGDP TETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLM DNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNKT GRDASVHTLLDALETLGERLANQKIEDHLL SSGKFMILEGNADSAMS	DR5 humano, com mutação K415N
SEQ ID NO: 45	DR5 humano (variante natural) (Acesso: AAB70578)	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGAR PGLRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQ DLAPQQRVAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISED GRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCD SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPE MCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVH KESGTKHSGEAPAVEETVTSSPGTPASPCSL	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		SGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLWKKVLP ILKGICSGGGGDPERVDRSSQRPGAEDNVL NEIVSILQPTQVPEQEMEVQEPAEPTGVNML SPGESEHLLEPAEAERSQRRRLLVPANEGDP TETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLM DNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNKT GRDASVHTLLDALETLGERLAKQKIEDHLL SSGKFMILEGNADSAMS	
SEQ ID NO: 46	DR5 humano (Uniprot O14763)	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGAR PGPRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQ DLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISED GRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCD SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPE MCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVH KESGTKHSGEVPAVEETVTSSPGTPASPCSL SGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLWKKVLP ILKGICSGGGGDPERVDRSSQRPGAEDNVL NEIVSILQPTQVPEQEMEVQEPAEPTGVNML SPGESEHLLEPAEAERSQRRRLLVPANEGDP TETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGLM DNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNKT GRDASVHTLLDALETLGERLAKQKIEDHLL SSGKFMILEGNADSAMS	
SEQ ID NO: 47	DR5del-K386N humano	MEQRGQNAPAASGARKRHGPGPREARGAR PGPRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQ DLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISED GRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCD SGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPE MCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVH KESGIIIGVTVAAVVLIVAVFVCKSLLWKKV LPILKGICSGGGGDPERVDRSSQRPGAEDNV LNEIVSILQPTQVPEQEMEVQEPAEPTGVNM LSPGESEHLLEPAEAERSQRRRLLVPANEGD PTETLRQCFDDFADLVPFDSWEPLMRKLGL MDNEIKVAKAEAAGHRDTLYTMLIKWVNK TGRDASVHTLLDALETLGERLANQKIEDHL LSSGKFMILEGNADSAMS	
SEQ ID NO: 48	DR5 de cinomolgo (NCBI XP_005562887.1)	MGQLRQSAPAASGARKGRGPGPREARGAR PGLRVLKTLVLVVAAARVLLSVSADCAPIT RQSLDPQRRAAPQQKRSSPTEGLCPPGHHIS EDSRECISCKYGQDYSTHWNDFLFCLRCTK CDSGEVEVNSCTTTRNTVCQCEEGTFREED SPEICRKCRTGCPRGMVKVKDCTPWSDIEC VHKESGTKHTGEVPAVEKTVTTSPGTPASP CSLSGIIIGVIVLVVIVVVAVIVWKTSLWKK VLPILKGVCSGGGGDPERVDSSSHSPQRPGA EDNALNEIVSIVQPSQVPEQEMEVQEPAEQT DVNTLSPGESEHLLEPAKAEGPQRRGQLVP VNENDPTETLRQCFDDFAAIVPFDAWEPLV RQLGLTNNEIKVAKAEAASSRDTLYVMLIK WVNKTGRAASVNTLLDALETLEERLAKQKI QDRLLSSGKFMILEDNADSATS	
SEQ ID NO: 49	DR5-K420N de cinimolgo	MGQLRQSAPAASGARKGRGPGPREARGAR PGLRVLKTLVLVVAAARVLLSVSADCAPIT RQSLDPQRRAAPQQKRSSPTEGLCPPGHHIS EDSRECISCKYGQDYSTHWNDFLFCLRCTK CDSGEVEVNSCTTTRNTVCQCEEGTFREED SPEICRKCRTGCPRGMVKVKDCTPWSDIEC VHKESGTKHTGEVPAVEKTVTTSPGTPASP CSLSGIIIGVIVLVVIVVVAVIVWKTSLWKK VLPILKGVCSGGGGDPERVDSSSHSPQRPGA EDNALNEIVSIVQPSQVPEQEMEVQEPAEQT DVNTLSPGESEHLLEPAKAEGPQRRGQLVP	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		VNENDPTETLRQCFDDFAAIVPFDAWEPLV RQLGLTNNEIKVAKAEAASSRDTLYVMLIK WVNKTGRAASVNTLLDALETLEERLANQKI QDRLLSSGKFMILEDNADSATS	
SEQ ID NO: 50	Cino DR5Mfdel-K420N	MGQLRQSAPAASGARKGRGPGPREARGAR PGLRVLKTLVLVVAAARVLLSVSADCAPIT RQSLDPQRRAAPQQKRSSPTEGLCPPGHHIS EDSRECISCKYGQDYSTHWNDFLFCLRCTK CDSGEVEVNSCTTTRNTVCQCEEGTFREED SPEICRKCRTGCPRGMVKVKDCTPWSDIEC VHKESGIIIGVIVLVVIVVVAVIVWKTSLWK KVLPILKGVCSGGGGDPERVDSSSHSPQRPG AEDNALNEIVSIVQPSQVPEQEMEVQEPAEQ TDVNTLSPGESEHLLEPAKAEGPQRRGQLV PVNENDPTETLRQCFDDFAAIVPFDAWEPL VRQLGLTNNEIKVAKAEAASSRDTLYVMLI KWVNKTGRAASVNTLLDALETLEERLANQ KIQDRLLSSGKFMILEDNADSATS	
SEQ ID NO: 51	VH chTRA8 CDR1	GFTFSSYV	
SEQ ID NO: 52	VH chTRA8 CDR2	ISSGGSYT	
SEQ ID NO: 53	VH chTRA8 CDR3	ARRGDSMITTDY	
SEQ ID NO: 54	VL chTRA8 CDR1	QDVGTA	
	VL chTRA8 CDR2	FOI	
SEQ ID NO: 55	VL chTRA8 CDR3	QQYSSYRT	
SEQ ID NO: 56	HC-chTRA8	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYVMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTY YPDSVKGRFTISRDNAKNTLILQMSSLRSED TAMYYCARRGDSMITTDYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 57	LC-chTRA8	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVG TAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVP DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQ YSSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	
SEQ ID NO: 58	Fc IgG1m(f)-E430G	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 59	Fc IgG1m(f)-E345K	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 60	Fc IgG1m(f)-S440Y	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKILSLSPGK	
SEQ ID NO: 61	Fc IgG1m(f)-E430G-K439E	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK	
SEQ ID NO: 62	Fc IgG1m(f)-E430G-S440K	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHGALHNHYTQKKLSLSPGK	
SEQ ID NO: 63	Fc IgG1m(f)-K409R	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 64	Fc IgG1m(f)-K409R-E345K	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 65	Fc IgG1m(f)-K409R-E430G	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY	

SEQ ID NO:	Nome	Sequência	Clone
		FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 66	Fc IgG1m(f)-F405L	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 67	Fc IgG1m(f)-F405L-E345K	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 68	Fc IgG1m(f)-F405L-E430G	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK	

Exemplos

Exemplo 1: Anticorpo e construtos antigênicos

Construtos de expressão para DR5

[00357] Os construtos otimizados no códon para a expressão de proteínas DR5 de tamanho completo de ser humano (SEQ ID NO: 46), macaco rhesus (SEQ ID NO: 25) e camundongo (SEQ ID NO: 26) foram gerados com base nas sequências disponíveis: DR5 de ser humano (*Homo sapiens*) (Genbank acesso no. NP_003833, UniprotKB/Swiss-Prot O14763-1), DR5 de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Genbank acesso no.

EHH28346), DR5 de murino (*Mus musculus*) (UniprotKB/Swiss-Prot Q9QZM4). Para o mapeamento das regiões de ligação dos anticorpos de DR5 (como descrito no Exemplo 6) os seguintes construtos de DR5 de ser humano/camundongo quiméricos foram fabricados; DR5 de ser humano em que, respectivamente, as seguintes partes foram substituídas pela sequência de DR5 de camundongo correspondente (os números se referem à sequência humana), construto A aa 56-68, construto B aa 56-78, construto C aa 69-78, construto D aa 79-115, construto E 79-138, construto F aa 97-138, construto G aa 139-166, construto H aa 139-182, construto I aa 167-182, construto J 167-210, construto K aa 183-210. A mutação de perda de função K415N foi introduzida no domínio da morte de DR5 de ser humano (SEQ ID NO: 44). Além disso, o construto otimizado no códon para o domínio extracelular (ECD) de DR5 humano com uma etiqueta His no terminal C foram gerados: DR5ECD-FcHistag (SEQ ID NO: 27) e DR5ECDdelHis (SEQ ID NO: 28). Todos os construtos contiveram sítios de restrição adequados para clonagem e uma sequência de Kozak ótima (GCCGCCACC). Os construtos foram clonados no vetor de expressão mamífero pcDNA3.3 (Invitrogen).

Construtos de expressão para anticorpos

[00358] Para a expressão de anticorpo as sequências VH e VL, como descritas mais no princípio, dos anticorpos de DR5 de ser humano/ camundongo quiméricos DR5-01 e DR5-05 (com base na EP2684896A1) e as suas variantes humanizadas hDR5-01 e hDR5-05 (com base na WO2014/009358) foram clonados em vetores de expressão (pcDNA3.3) contendo as regiões constantes HC e LC relevantes. As mutações desejadas foram introduzidas pela síntese gênica ou mutagênese loco dirigida.

[00359] Em alguns dos Exemplos, anticorpos de referência contra DR5 foram usados que foram anteriormente descritos. IgG1-CONA (com base na US7521048 B2 e WO2010/138725) e IgG1-chTRA8 (com base na EP1506285B1 e US7244429B2) foram clonados nos vetores de expressão do

anticorpo relevantes como acima.

[00360] Em alguns dos exemplos o anticorpo IgG1 humano IgG1-b12, um anticorpo específico de gp120 foi usado como um controle negativo (Barbas *et al*., J Mol Biol. 5 de abril de 1993; 230(3): 812-23).

Expressão transitória

[00361] Os anticorpos foram expressos como IgG1,κ. As misturas de DNA plasmídico codificando as cadeias tanto leves quanto pesadas de anticorpos foram transitoriamente transfectadas em células Expi293F (Life technologies, USA) usando 293fectina (Life technologies) essencialmente como descrito por Vink *et al*. (Vink *et al*., Methods, 65 (1), 5-10 2014).

[00362] As proteínas de membrana foram expressas em células CHO-S Freestile (Life technologies), usando o reagente freestile Max, como descrito pelo fabricante.

Purificação e análise de proteínas

[00363] Os anticorpos foram purificados pela cromatografia em proteína G imobilizada. A proteína recombinante etiquetada com His foi purificada pela cromatografia de afinidade com metal imobilizada. Os lotes de proteína foram analisados por vários ensaios bioanalíticos incluindo SDS-PAGE, cromatografia por exclusão de tamanho e medição dos níveis de endotoxina.

Geração de anticorpos biespecíficos

[00364] Anticorpos IgG1 biespecíficos foram gerados pela troca do braço Fab sob condições redutoras controladas. A base para este método é o uso de domínios CH3 complementares, que promovem a formação de heterodímeros sob condições de ensaio específicas como descrito na WO2011/131746. As mutações F405L e K409R (na numeração EU) foram introduzidas em anticorpos IgG1 anti-DR5 para criar pares de anticorpos com domínios CH3 complementares. A mutação F405L foi introduzida em IgG1-DR5-05 e IgG1-DR5-05-E430G; a mutação K409R foi introduzida em IgG1-

DR5-01 e IgG1-DR5-01-E430G. Para gerar anticorpos biespecíficos, os dois anticorpos precursores complementares, cada anticorpo em uma concentração final de 0,5 mg/mL, foram incubados com 75 mM de 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) em um volume total de 100 μL de TE a 31°C durante 5 horas. A reação de redução foi interrompida pela remoção do agente redutor 2-MEA usando colunas giratórias (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acordo com o protocolo do fabricante. Deste modo os anticorpos biespecíficos IgG1-DR5-01-K409R x IgG1-DR5-05-F405L (BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L) e IgG1-DR5-01-K409R-E430G x IgG1-DR5-05-F405L-E430G (BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G) foram gerados.

[00365] A mutação K409R e/ou a mutação F405L não tiveram nenhum efeito sobre a ligação do anticorpo ao antígeno correspondente. Isto é a mutação K409R e/ou a mutação F405L não teve nenhum efeito da ligação do anticorpo anti-DR5 ao DR5.

Exemplo 2: Níveis de expressão de DR5 nas linhagens de célula cancerosa humana diferentes

[00366] A densidade de DR5 por célula foi quantificada para as linhagens de célula cancerosa humana diferentes pela imunofluorescência indireta usando QIFIKIT (DAKO, Cat nº K0078) com anticorpo monoclonal de camundongo B-K29 (Diaclone, Cat nº 854.860.000). As células foram coletadas pela tripsinização e passadas através de uma peneira de célula. As células foram pelotizadas pela centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm, lavadas com PBS e recolocadas em suspensão em uma concentração de $2x10^6$ células/mL. As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. 50 μL das suspensões de célula única (100.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-A, Cat nº 650101). As células foram pelotizadas pela centrifugação durante 3 minutos a 300xg e recolocadas em suspensão em 50 μL de amostra de anticorpo ou amostra de controle de isótipo IgG1 de camundongo (BD/Pharmingen, Cat nº 555746)

em concentrações saturantes de 10 μg/mL. Depois de uma incubação de 30 minutos a 4°C, as células foram pelotizadas e recolocadas em suspensão em 150 μL de tampão FACS (PBS + 0,1% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) + 0,02% (p/v) de azida de sódio). Grânulos de ajuste e calibração foram adicionados à placa de acordo com as instruções do fabricante. As células e grânulos em paralelo foram lavados mais duas vezes com 150 μL de tampão FACS e recolocadas em suspensão em 50 μL de IgG de cabra anticamundongo conjugada com FITC (1/50; DAKO, Cat nº F0479). O anticorpo secundário foi incubado durante 30 minutos a 4°C protegido da luz. As células e grânulos foram lavados duas vezes com 150 μL de tampão de FACS e recolocados em suspensão em 150 μL de tampão FACS. A imunofluorescência foi medida em um FACS Canto II (BD Biosciences) registrando-se 10.000 eventos dentro da população de células viáveis. A média geométrica da intensidade de fluorescência dos grânulos de calibração foi usada para calcular a curva de calibração que foi forçada ir através de zero de intensidade e zero de concentração usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para cada linhagem de célula, a capacidade de ligação de anticorpo (ABC), uma estimativa para o número de moléculas de DR5 expressas na membrana plasmática, foi calculada usando a média geométrica da intensidade de fluorescência das células tingidas com anticorpo DR5, com base na equação da curva de calibração (interpolação de desconhecidos da curva padrão, usando Software GraphPad). Geralmente, a superfície da célula expressão de DR5 foi de baixa a moderada nas linhagens de célula aqui avaliadas. Com base nestes dados, as linhagens de célula foram categorizadas de acordo com a baixa expressão de DR5 (ABC < 10.000) e expressão de DR5 moderada (ABC > 10.000). As linhagens de célula de câncer colônico HCT-15 (ATCC, CCL-225), HT-29 (ATCC, HTB-38) e SW480 (ATCC, CCL-228), BxPC-3 (ATCC, CRL-1687), HPAF-II (ATCC, CRL-1997) e câncer pancreático PANC-1 (ATCC, CRL-1469) e A549

(ATCC, CCL-185) e câncer pulmonar SK-MES-1 (ATCC, HTB-58) foram verificadas ter baixa expressão de DR5 (QIFIKIT ABC faixa 3.081 a 8.411). As linhagens de célula de câncer colônico COLO 205 (ATCC CCL-222®) e HCT 116 (ATCC CCL-247), câncer de pele A375 (ATCC, CRL-1619) e câncer gástrico SNU-5 (ATCC, CRL-5973) foram verificadas ter expressão moderada de DR5 (QIFIKIT ABC faixa 10.777 a 21.262).

Exemplo 3: Ligação de anticorpos DR5-01 e DR5-05 humanizados às células HCT 116

[00367] Os anticorpos humanizados hDR5-01 e hDR5-05 estão descritos no pedido de patente WO2014/009358. A ligação de IgG1-hDR5-01-K409R e IgG1-hDR5-05-F405L purificados às células de câncer de cólon humano HCT 116 positivas em DR5 foi analisada e comparada com a ligação dos anticorpos quiméricos IgG1-DR5-01-K409R e IgG1-DR5-05-F405L pela análise FACS. Para preparar suspensões de célula única, as células HCT 116 aderentes foram lavadas duas vezes com PBS (B. Braun; Cat nº 3623140) antes de incubar com Tripsina 1x/EDTA 0,05% durante 2 minutos a 37°C. 10 mL de meio [meio 5A de McCoy com L-Glutamina e HEPES (Lonza; Cat nº BE12-168F) + 10% de Soro Bovino Doador com Ferro (Life Technologies; Cat nº 10371-029) + 100 Unidades de Penicilina / 100 Unidades de Estreptomicina (Lonza Cat nº DE17-603E)] foram adicionadas antes de pelotizar as células pela centrifugação durante 5 minutos a 1200 rpm. As células foram recolocadas em suspensão em 10 mL de meio, pelotizadas mais uma vez pela centrifugação durante 5 minutos a 1200 rpm e recolocadas em suspensão em tampão FACS em uma concentração de 1,0 x 10^6 células/mL. As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. Amostras de 100 µL de suspensão de célula (100.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-A; Cat nº 650101) e pelotizadas pela centrifugação a 300x g durante 3 minutos a 4°C. As células foram recolocadas em suspensão em amostras de 100 µL de uma série de

preparação de anticorpo com diluição em série (faixa de 0 a 10 μg/mL em diluições de 5 vezes) e incubadas durante 30 minutos a 4°C. As células foram pelotizadas pela centrifugação a 300x g durante 3 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com 150 μL de tampão FACS. As células foram incubadas com 50 μL de anticorpo secundário IgG $F(ab')_2$ de cabra anti-humano conjugado à R-ficoeritrina (R-PE) (Jackson ImmunoResearch; Cat nº 109-116-098; 1/100) durante 30 minutos a 4°C, protegido da luz. As células foram lavadas duas vezes com 150 μL de tampão FACS, recolocadas em suspensão em 150 μL de tampão FACS e a ligação de anticorpo foi analisada em um FACS Canto II (BD Biosciences) pelo registro de 10.000 eventos. As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinações variáveis) usando o software GraphPad Prism.

[00368] Como pode ser observado a partir da Figura 2 que mostra que os anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R e IgG1-hDR5-05-F405L mostraram curvas de ligação similares como seu anticorpo quimérico correspondente IgG1-DR5-01-K409R ou IgG1-DR5-05-F405L, respectivamente. A humanização não teve nenhum efeito sobre a ligação dos anticorpos DR5.

Exemplo 4: Introdução de uma mutação realçadora da hexamerização não afeta a ligação de anticorpos DR5-01 e DR5-05 quimérico e anticorpo DR5-01xDR5-05 biespecífico às células de câncer de cólon humano positivas.

[00369] A ligação de variantes de anticorpo purificadas de IgG1-DR5-01-K409R, IgG1-DR5-05-F405L e anticorpo biespecífico IgG1-DR5-01-K409RxIgG1-DR5-05-F405L (BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L) com e sem uma mutação realçadora da hexamerização (E430G ou E345K) às células de câncer de cólon humano COLO 205 foi analisada pela análise FACS. As células foram coletadas reunindo-se o sobrenadante de cultura contendo células não aderentes e células COLO 205 aderentes tripnizadas. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em

suspensão em 10 mL de meio de cultura [RPMI 1640 com 25 mM de Hepes e L-Glutamina (Lonza Cat nº BE12-115F) + 10% de Soro Bovino Doador com Ferro (Life Technologies Cat nº 10371-029) + 50 Unidades de Penicilina / 50 Unidades de Estreptomicina (Lonza Cat nº DE17-603E)]. As células foram contadas, centrifugadas mais uma vez e recolocadas em suspensão em tampão de FACS em uma concentração de 0,3 x 10^6 células/mL. As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. Amostras de 100 µL de suspensão de célula (30,000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo e pelotizadas pela centrifugação a 300xg durante 3 minutos a 4°C. As células foram recolocadas em suspensão em amostras de 50 µL de uma série de preparação de anticorpo com diluição em série (concentrações finais na faixa de 0 a 10 µg/mL em diluições de 5 vezes) e incubadas durante 30 minutos a 4°C. As placas foram centrifugadas a 300xg durante 3 minutos a 4°C e as células foram lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS. As células foram incubadas com 50 µL de anticorpo secundário IgG $F(ab')_2$ de cabra anti-humano conjugado a R-PE (Jackson ImmunoResearch; Cat nº 109-116-098; 1/100) durante 30 minutos a 4°C protegido da luz. As células foram lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS, recolocadas em suspensão em 100 µL de tampão FACS e a ligação de anticorpo foi analisada em um FACS Canto II (BD Biosciences) pelo registro de 5.000 eventos. As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism.

[00370] A Figura 3A mostra que os anticorpos IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-01-K409R-E345K mostraram ligação similar dependente da dose às células de câncer de cólon humano COLO 205 como IgG1-DR5-01-K409R. A Figura 3B mostra que os anticorpos IgG1-DR5-05-F405L-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E345K mostraram ligação similar dependente da dose às células COLO 205 como IgG1-DR5-05-F405L. A Figura 3C

mostra que BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G e BsAb DR5-01-K409R-E345K x DR5-05-F405L-E345K mostraram ligação similar dependente da dose às células COLO 205 como BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L. Estes dados indicam que a introdução das mutações realçadoras de hexamerização E430G ou E345K não afetaram a ligação dos anticorpos IgG1-DR5-01-K409R, IgG1-DR5-05-F405L e BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L nas células COLO 205 positivas em DR5.

Exemplo 5: Ligação de anticorpos DR5-01 e DR5-05 quiméricos ao DR5 de macaco Rhesus.

[00371] A ligação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G purificado às células CHO expressando DR5 de macaco Rhesus ou DR5 humano (descrito no Exemplo 1) foi analisada pela análise FACS. Um dia antes da análise FACS, as células CHO foram transitoriamente transfectadas com um vetor codificando DR5 de macaco Rhesus, DR5 humano ou um vetor não codificador (simulado). Para preparar suspensões de célula única, as células foram lavadas com PBS e recolocadas em suspensão em tampão FACS em uma concentração de 1,0 x 10^6 células/mL. As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. 75 µL de amostras de suspensão de célula (75.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo e pelotizadas pela centrifugação a 300xg durante 3 minutos a 4°C. As células foram recolocadas em suspensão em amostras de 50 µL de uma série de preparação de anticorpo com diluição em série (faixa de 10 a 0 µg/mL em diluições de 5 vezes) e incubadas durante 30 minutos a 4°C. As placas foram centrifugadas a 300xg durante 3 minutos a 4°C e as células foram lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS. As células foram incubadas com 50 µL de anticorpo secundário de IgG $F(ab')_2$ de cabra anti-humano conjugado a R-PE (Jackson ImmunoResearch; Cat nº 109-116-098; 1/100) durante 30 minutos a 4°C protegidos da luz. As células foram lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS, recolocadas em suspensão

em 100 µL de tampão FACS e a ligação de anticorpo foi analisada em um FACS Canto II (BD Biosciences) pelo registro de 100.000 eventos. As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism.

[00372] A Figura 4 mostra que os anticorpos IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G mostraram ligação dependente da dose ao DR5 de macaco Rhesus expresso nas células CHO. A ligação às células CHO transfectadas com DR5 humano e célula CHO transfectada simulado foi testada como controles positivo e negativo, respectivamente. Tanto para IgG1-DR5-01-K409R-E430G quanto para IgG1-DR5-05-F405L-E430G, os valores EC_{50} quanto à ligação ao DR5 humano e DR5 de macaco Rhesus foram na mesma faixa ([0,014-0,023 µg/mL] e [0,051-0,066 µg/mL], respectivamente), indicando que IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G mostram ligação comparável ao DR5 humano e de macaco Rhesus.

Exemplo 6: Mapeamento de regiões de ligação dos anticorpos DR5-01 e DR5-05 no DR5 humano usando moléculas de DR5 trocadas em domínio.

[00373] As sequências de aminoácidos dos domínios extracelulares de DR5 humano e de murino mostram homologia limitada (Figura 5 A) e os anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-F405L e IgG1-hDR5-05-F405L não ligam DR5 de murino (Figura 5 C, D). Com o objetivo de identificar trechos de aminoácido no domínio extracelular de DR5 humano que estejam envolvidos na ligação de anticorpo, nós desenvolvemos onze moléculas de DR5 quiméricas de ser humano-camundongo, em que domínios de DR5 humano específicos foram substituídos pelos análogos de camundongo (moléculas de DR5 trocadas em domínio descritas no Exemplo 1) como visualizado na Figura 5 B. As variantes de DR5 trocadas em domínio foram transitoriamente expressas nas células CHO. A perda de ligação dos

anticorpos DR5 às moléculas de DR5 trocadas em domínio indica que o domínio trocado de DR5 humano contém um ou mais aminoácidos que são cruciais para a ligação. Vice-versa, a retenção da ligação dos anticorpos DR5 às moléculas de DR5 trocadas em domínio indica que o domínio trocado de DR5 humano não contém os aminoácidos que são cruciais para a ligação. Para o ensaio de ligação, 3 x 10^6 células transfectadas foram lavadas e recolocadas em suspensão em 3 mL de tampão FACS. 100 µL de suspensão de célula foram adicionados por poço (100.000 células por poço) de placas de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-a; Cat nº 650101). As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. As células foram pelotizadas, recolocadas em suspensão em 50 µL de amostra de anticorpo DR5 (concentração final de 10 µg/mL) e incubadas durante 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes e incubadas em 50 µL de anticorpo secundário IgG $F(ab')_2$ de cabra anti-humano conjugado a R-PE (Jackson ImmunoResearch; Cat nº 109-116-098; 1/100) durante 30 minutos a 4°C protegido da luz. As células foram lavadas duas vezes, recolocadas em suspensão em 120 µL de tampão FACS e analisadas em um FACS Canto II (BD Biosciences). A porcentagem de células viáveis positivas em PE foi plotada usando o software GraphPad Prism. A expressão superficial foi confirmada para cada molécula de DR5 trocada em domínio usando um painel de anticorpos DR5 direcionados contra epítopos diferentes (não mostrado). O anticorpo de ligação não alvo IgG1-b12 contra gp120 foi incluído como um controle negativo para a ligação. A Figura 5 C mostra que IgG1-hDR5-01-F405L mostrou perda de ligação aos construtos E (79-138), F (97-138), G (139-166) e H (139-182), ao passo que a ligação aos construtos A-D (abrangendo a sequência de DR5 humana 56-115) e I-K (abrangendo a sequência de DR5 humano 167-210) foi retida. Juntos, estes dados indicam que as regiões de aminoácido 116-138 e 139-166 cada uma contém um ou mais aminoácidos requeridos para a ligação de IgG1-hDR5-01-F405L ao DR5 humano. A Figura 5 D mostra que IgG1-hDR5-05-

F405L mostrou perda de ligação aos construtos D (79-115) e (79-138) e F (97-138), ao passo que a ligação aos construtos A-C (abrangendo a sequência de DR5 humano 56-78) e G-K (abrangendo a sequência de DR5 humano 139-210) foi retida. Juntos, estes dados indicam que a região de aminoácido 79-138 contém um ou mais aminoácidos requeridos para a ligação de IgG1-hDR5-05-F405L ao DR5 humano.

Exemplo 7: ELISA de Bloqueio Cruzado com Anticorpos DR5-01 e DR5-05.

[00374] A competição entre anticorpos DR5-01 e DR5-05 humanizados quanto à ligação ao domínio extracelular de DR5 foi medido pelo ensaio de ligação de sanduiche em um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) em sanduiche como descrito neste exemplo e pela interferometria Bio-Layer (BLI) usando um sistema ForteBio Octet® HTX (dados não mostrados). Para o ELISA, placas de ELISA de 96 poços de fundo chato (Greiner bio-a; Cat nº 655092) foram revestidos durante a noite a 4°C com 2 μg/mL de anticorpo DR5 (IgG1-hDR5-01-E430G ou IgG1-hDR5-05-E430G) em 100 μL de PBS. Os poços foram bloqueados pela adição de 200 μL de PBSA [PBS/ 1% de Albumina sérica bovina (BSA; Roche Cat # 10735086001)] e incubados durante 1 hora na temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com PBST [PBS/ 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich; Cat nº 63158)]. Em seguida, DR5ECD-FcHistag (SEQ ID 27) (concentração final de 0,2 μg/mL) e anticorpo competidor (concentração final de 1 μg/mL) foram adicionados em um volume total de 100 μL de PBSTA (PBST/ 0,2% de BSA) e incubados durante 1 hora na temperatura ambiente sob agitação. Depois de lavar três vezes com PBST, os poços foram incubados em um agitador ELISA com 100 μL de anticorpo antietiqueta His biotinilado (R&D Systems; Cat nº BAM050; 1:2.000) em PBSTA durante uma hora na temperatura ambiente. Depois de lavar três vezes com PBST, os poços foram incubados com Poli-HRP rotulado com estreptavidina (Sanquin; Cat nº M2032; 1:10.000) em PBSTA durante 20 minutos na temperatura

ambiente em um agitador ELISA. Depois de lavar três vezes com PBST, a reação foi visualizada através de uma incubação com 100 µL do ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico [ABTS (Roche; Cat nº 11112597001)] durante 30 minutos na RT protegido da luz. A reação de substrato foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido oxálico a 2%. A fluorescência a 405 nm foi medida em uma leitora ELISA (BioTek ELx808 Absorbance Microplate Reader). A Figura 6 mostra a competição de ligação expressa como porcentagem de inibição de DR5ECD-FcHisCtag da ligação ao anticorpo revestido na presença de anticorpo competidor, em relação à ligação de DR5ECD-FcHisCtag na ausência de anticorpo competidor (% de inibição = 100 – [(ligação na presença de anticorpo competidor/ligação na ausência de anticorpo competidor)]*100). A ligação de DR5ECD-FcHistag ao IgG1-hDR5-01-E430G revestido não foi inibida na presença de IgG1-hDR5-05-E430G solúvel. Vice-versa, a ligação de DR5ECD-FcHistag ao IgG1-hDR5-05-E430G revestido também não foi inibida na presença de solúvel IgG1-hDR5-01-E430G. Estes dados indicam que IgG1-hDR5-01-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G não competem entre si quanto à ligação de DR5ECD-FcHisCtag, sugerindo que eles reconhecem epítopos distintos no domínio extracelular de DR5 humano. Estes dados foram confirmados pela BLI usando um ensaio de sanduiche clássico, em que IgG1-hDR5-01-F405L ou IgG1-hDR5-05-F405L (20 µg/ml em 10 mM de Acetato de Sódio pH 6,0, ForteBio Cat nº 18-1070) foram imobilizados nos biossensores de Segunda Geração Reativos em Amina (ForteBio Cat nº 18-5092). Subsequentemente, os biossensores foram incubados com DR5ECDdelHis (SEQ ID 28) (100 nM em Diluente de Amostra, ForteBio Cat nº 18-1048) e ligação de anticorpo competidor (5 µg/mL em Diluente de Amostra) foi analisada (dados não mostrados).

Exemplo 8: Introdução de uma mutação realçadora da hexamerização melhora a eficácia de indução da morte celular pelos anticorpos DR5-01 e

DR5-05 e da combinação dos mesmos.

[00375] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar o efeito da mutação realçadora de hexamerização E430G em IgG1-DR5-01-K409R e IgG1-DR5-05-F405L sobre a capacidade dos anticorpos para matar células de câncer de cólon humano COLO 205 e HCT 116. Os anticorpos foram testados como agente único e como combinações de anticorpos DR5-01 e DR5-05. As células COLO 205 foram coletadas reunindo-se o sobrenadante de cultura contendo células não aderentes e células aderentes tripsinizadas. As células HCT 116 foram coletadas pela tripsinização. As células foram passadas através de uma peneira de célula, pelotizadas pela centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em meio de cultura em uma concentração de 0,5 x 10^5 células/mL. 100 µL da suspensão de célula única (5.000 células por poço) foram semeados em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182). 50 µL de uma série de preparação de anticorpo com diluição em série (faixa de 0,05 a 20.000 ng/mL de concentrações finais em diluições de 5 vezes) foram adicionados e incubados durante 3 dias a 37°C. Nas amostras que foram tratadas com uma combinação de dois anticorpos, a concentração de anticorpo total no ensaio foi o mesmo como nas amostras que foram tratadas com anticorpos isolados. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). A viabilidade das células cultivadas foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo (Promega, Cat nº G7571) que quantifica o ATP presente, que é um indicador de células metabolicamente ativas. A partir do kit, 20 µL de reagente de solução de luciferina foram adicionados por poço e misturados pela agitação da placa durante 2 minutos a 500 rpm. Em seguida, as placas foram incubadas durante 1,5 hora a 37°C. 100 µL de sobrenadante foram transferidos para uma OptiPlate-96 branca (Perkin Elmer, Cat nº 6005299) e a luminescência foi medida em uma Leitora de Multirrótulo EnVision

(PerkinElmer). Os dados foram analisados e plotados usando regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism. A Figura 7 mostra a porcentagem de células viáveis, como calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = [(amostra de anticorpo com luminescência - amostra de estaurosporina com luminescência)/(amostra de anticorpo sem luminescência - amostra de estaurosporina com luminescência)]*100.

[00376] A Figura 7 mostra que a introdução da mutação E430G realçou a potência dos anticorpos quiméricos IgG1-DR5-01-K409R e IgG1-DR5-05-F405L tanto na célula COLO 205 (A) quanto na HCT 116 (B). A combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi mais potente do que cada anticorpo sozinho e mais potente do que a combinação dos anticorpos sem a mutação E430G. A combinação de IgG1-DR5-01-K409R e IgG1-DR5-05-F405L foi mais potente do que cada anticorpo sozinho. Estes dados mostram que a introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G resultou em indução realçada do extermínio de célula na ligação dos anticorpos DR5 quiméricos 01 e 05, ambos como anticorpos isolados e em combinação, com a combinação sendo o mais potente.

Exemplo 9: Combinar dois anticorpos DR5 que não bloqueiem cruzado com mutações realçadoras de hexamerização resulta em matança de célula alvo realçada

[00377] No Exemplo 8 é mostrado que combinar os dois anticorpos anti-DR5 que não bloqueiam cruzado IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G com mutações realçadoras de hexamerização resultou no extermínio realçado nas linhagens de célula cancerosa comparada com a eficácia dos anticorpos isolados. Aqui, nós comparamos a eficácia de dois anticorpos que não bloqueiam cruzado versus dois anticorpos anti-DR5 que bloqueiam cruzado. Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a

capacidade da combinação dos anticorpos IgG1-chTRA8-F405L-E430G com anticorpo que não bloqueia cruzado IgG1-DR5-01-K409R-E430G ou anticorpo que bloqueia cruzado IgG1-DR5-05-F405L-E430G para induzir o extermínio de células de câncer de cólon HCT 116 em comparação com os anticorpos simples. Um ELISA de bloqueio cruzado para os anticorpos IgG1-chTRA8-F405L e IgG1-DR5-05-F405L foi realizado como descrito no Exemplo 7 e confirmado por um ensaio de ligação de sanduiche em um sistema Octet® HTX (dados não mostrados). O ensaio de viabilidade nas células HCT 116 foi realizado como descrito no Exemplo 8 com uma série de anticorpo diluída em série variando de 0,00005 a 20 μg/mL de concentrações finais em diluições de 5 vezes. A Figura 8 mostra que a eficácia dos anticorpos isolados no extermínio de células HCT116 foi realçada combinando-se os dois anticorpos que não bloqueiam cruzados IgG1-chTRA8-F405L-E430G e IgG1-DR5-01-K409R-E430G (Figura 8 B) e combinando-se os dois anticorpo que não bloqueiam cruzados IgG1-chTRA8-F405L-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G (Figura 8 C).

Exemplo 10: Capacidade da combinação de anticorpos que não bloqueiam cruzado DR5-05 + CONA e anticorpo biespecífico DR5-05xCONA com mutações realçadoras de hexamerização para induzir o extermínio da célula alvo.

[00378] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a capacidade de uma outra combinação de dois anticorpo que não bloqueiam cruzado (IgG1-CONA-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E345K) e seu derivado biespecífico BsAb IgG1-CONA-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E345K para induzir o extermínio de células de câncer de cólon HCT 116 em comparação com a combinação de anticorpos e o anticorpo biespecífico sem mutação realçadora de hexamerização, respectivamente. Um ELISA de bloqueio cruzado para os anticorpos IgG1-CONA-K409R e IgG1-DR5-05-F405L foi realizado como descrito no Exemplo 7 e confirmado por um ensaio

de ligação de sanduiche em um sistema Octet® HTX (dados não mostrados). O ensaio de viabilidade nas células HCT 116 foi realizado como descrito no Exemplo 8 com uma série de anticorpo diluída em série variando de 0,01 a 20.000 ng/mL de concentrações finais em diluições de 5 vezes. A Figura 9 mostra que a combinação de anticorpos que não bloqueiam cruzado IgG1-CONA-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E345K e BsAb IgG1-CONA-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E345K com mutações realçadoras de hexamerização mostraram eficácia realçada no extermínio de células HCT116 comparadas com estes anticorpos sem as mutações realçadoras de hexamerização E430G ou E345K.

Exemplo 11: Capacidade da combinação de anticorpo DR5-01 + DR5-05 com mutação realçadora de hexamerização E430G para induzir o extermínio de célula alvo em linhagens de célula cancerosa diferentes.

[00379] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a capacidade da combinação de anticorpos quiméricos de ser humano-camundongo IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L com e sem a mutação realçadora de hexamerização E430G para induzir o extermínio das células de câncer de cólon COLO 205, HCT-15, HCT 116, HT-29 e câncer pancreático SW480, BxPC-3, HPAF-II e câncer gástrico PANC-1, SNU-5, A549 e câncer pulmonar SK-MES-1 e câncer de pele A375. As células aderentes foram coletadas pela tripsinização e passadas através de uma peneira de célula. As células foram pelotizadas pela centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em meio de cultura em uma concentração de 0,5 x 10^5 células/mL [COLO 205, HCT-15, SW480 e BxPC-3: RPMI 1640 com 25 mM de Hepes e L-Glutamina (Lonza Cat nº BE12-115F) + 10% de DBSI (Life Technologies Cat nº 10371-029) + Pen/Estrep (Lonza Cat nº DE17-603E); HCT116 e HT-29: Meio 5A de McCoy com L-Glutamina e Hepes (Lonza, Cat nº BE12-168F) + 10% de DBSI + Pen/Estrep; HPAF-II e SK-MES-1: Meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM, ATCC Cat

nº 30-2003) + 10% de DBSI + Pen/Estrep; PANC-1 e A375: DMEM 4,5 g/L Glicose sem L-Gln com HEPES (Lonza Cat nº LO BE12-709F) + 10% de DBSI + 1 mM de L-Glutamina (Lonza Cat nº BE17-605E) + Pen/Estrep; SNU-5: IMDM (Lonza Cat nº BE12-722F) + 10% de DBSI + Pen/Estrep; A549: F-12K Meio (ATCC Cat nº 30-2004) + 10% de DBSI + 1 mM de L-Glutamina + Pen/Estrep]. 100 µL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e incubadas durante a noite a 37°C. O sobrenadante das células aderentes foi recolocado em 150 µL de amostra de anticorpo (concentração final de 10 µg/mL) e incubadas durante 3 dias a 37°C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. Para todas as linhagens de célula testadas, a porcentagem de células viáveis foi significantemente mais baixa depois da incubação com 10 µg/mL da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G do que depois da incubação com o anticorpo de controle negativo de ligação não alvo IgG1-b12 (Figura 10). Em todas exceto duas das linhagens de célula testadas, a eficácia da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significantemente melhor do que para a combinação IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L sem mutação realçadora de hexamerização. Estes dados indicam que a combinação de anticorpos DR5 quiméricos com mutações realçadoras de hexamerização IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi muito eficaz no extermínio de células alvos cancerosas de origem diferente, incluindo câncer colônico, pancreático, gástrico, pulmonar e de pele, sem a necessidade de um agente de reticulação secundário. Não houve nenhuma correlação entre a eficácia de matança de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e

os níveis de expressão alvo de DR5 (descrito no Exemplo 2).

Exemplo 12: Capacidade da combinação de anticorpo humanizado DR5-01 + DR5-05 com mutação realçadora de hexamerização E430G para induzir o extermínio de célula alvo.

[00380] Um ensaio de viabilidade foi realizada para comparar a potência da combinação de anticorpos quiméricos IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G com a potência da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G para induzir o extermínio de células de câncer pancreático BxPC-3 e PANC-1 *in vitro*. As células foram coletadas pela tripsinização e passadas através de uma peneira de célula. As células foram pelotizadas pela centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em meio de cultura em uma concentração de 0,5 x 10^5 células/mL. 100 µL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e incubadas durante a noite a 37°C. O sobrenadante das células aderentes foi recolocado em 150 µL de amostra de anticorpo de uma série de preparação de anticorpo com diluição em série e incubado durante 3 dias a 37°C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. A combinação dos anticorpos humanizados com mutação realçadora de hexamerização IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G mostrou curvas de dose-resposta similares como a combinação do anticorpos quiméricos correspondentes IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (Figura 11).

Exemplo 13: Otimização de anticorpo IgG1-hDR5-01-E430G

[00381] A sequência de aminoácidos N55-G56 foi identificada como

um motivo de desamidação de asparagina (Asn) potencial nas regiões CDR2 das cadeias pesadas IgG1-hDR5-01 e IgG1-hDR5-05 (SEQ ID NO: 2). A desamidação nesta posição foi imitada pela introdução da mutação N55D em IgG1-hDR5-01-K409R e IgG1-hDR5-05-F405L para testar o efeito de desamidação sobre a ligação alvo. IgG1-hDR5-01-N55D-K409R e IgG1-hDR5-05-N55D-F405L foram testados quanto à ligação às células HCT 116 pela análise FACS como descrito no Exemplo 3. A Figura 12A mostra que imitando a desamidação pela introdução da mutação N55D resultou em ligação fortemente diminuída de IgG1-hDR5-01-K409R nas células HCT 116. Ao contrário, IgG1-hDR5-05-F405L e IgG1-hDR5-05-N55D-F405L mostraram curvas de ligação comparáveis. Para reduzir o risco de desamidação de Asn no anticorpo DR5-01, a mutação G56T foi introduzida em IgG1-hDR5-01-E430G e esta variante de anticorpo foi testada quanto à ligação às células HCT 116 pela análise FACS como descrito no Exemplo 3. A Figura 12B mostra que a mutação não teve nenhum efeito sobre a ligação de IgG1-hDR5-01-E430G às células HCT 116.

[00382] Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a capacidade da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G com a capacidade da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio de células de câncer pancreático BxPC-3. A viabilidade foi avaliada como descrito no Exemplo 11 com 1.000 células por poço e série de concentrações de anticorpo variando de 0,0001 a 10.000 ng/mL nas concentrações finais em diluições de 4 vezes em um volume total de 200 μL. A Figura 12C mostra que a introdução da mutação G56T em IgG1-hDR5-01-E430G não teve nenhum efeito sobre a eficácia de matança do anticorpo em combinação com IgG1-hDR5-05-E430G.

Exemplo 14: Indução da morte celular através da combinação de anticorpos humanizados hDR5-01-G56T-E430G e hDR5-05-E430G

requer interações de Fc:Fc para formar hexâmeros

[00383] Para analisar o requerimento da formação de anticorpo de hexâmero por IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G para induzir a morte celular, fizemos uso das mutações de auto repulsão K439E e S440K (Diebolder *et al*., Science. 2014 mar 14;343(6176): 1260-3). A repulsão de Fc entre os anticorpos, isto é, introduzida pela presença de K439E ou S440K em um anticorpo de IgG1 ou em uma combinação de anticorpos resulta na inibição da hexamerização, mesmo na presença de uma mutação realçadora de hexamerização tal como E345K ou E430G (WO2013/0044842). A repulsão pelas mutações de K439E e S440K é neutralizada combinando-se ambas as mutações em uma mistura de dois anticorpos cada uma ancorando uma ou a outra mutação, resultando na restauração das interações de Fc: Fc e hexamerização.

[00384] Tanto para IgG1-hDR5-01-G56T-E430G quanto para IgG1-hDR5-05-E430G, as variantes com a mutação K439E ou S440K foram geradas e testadas em todas as combinações diferentes. Um ensaio de viabilidade foi realizado com uma série de preparação de anticorpo de diluição serial variando em concentrações totais de 0,3 a 20.000 ng/mL em diluições de 4 vezes em células de câncer pancreático BxPC-3 e de cólon HCT-15 como descrito no Exemplo 11.

[00385] A Figura 13 mostra que a combinação das variantes IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G ambas ancorando a mesma mutação de repulsão (K439E ou S440K) mostrou uma eficácia de matança fortemente diminuída nas células BxPC-3 (A) e HCT-15 (B). A eficácia de matança foi restaurada quando a repulsão foi neutralizada combinando-se dois anticorpos, cada um tendo uma das mutações K439E ou S440K complementares. Estes dados indicam que a hexamerização pelas interações de Fc-Fc é necessária para a indução da morte celular por IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G.

Exemplo 15: Interações de anticorpo Fc-Fc são envolvidas no agrupamento de DR5 e indução da apoptose através da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G com mutações que realçam a hexamerização.

[00386] Para testar o envolvimento da hexamerização de anticorpo mediada por Fc-Fc na indução da morte celular através da combinação de um anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, fizemos o uso do peptídeo de 13 resíduos DCAWHLGELVWCT (DeLano *et al*., Science 18 de fevereiro de 2000;287(5456): 1279-83) que liga à Fc em uma região contendo os aminoácidos de núcleo no caminho hidrofóbico que estão envolvidos nas interações de Fc-Fc (Diebolder *et al*., Science. 14 de março de 2014;343(6176): 1260-3). Um ensaio de viabilidade nas células BxPC-3 foi realizado como descrito no Exemplo 11 para a combinação dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G na presença ou ausência do peptídeo. Em resumo, depois da incubação da células durante a noite a 37º C, o meio de cultura foi removido e recolocado em 100 μL de meio de cultura contendo uma série de diluição (faixa de 0 a 100 μg/mL) do peptídeo DCAWHLGELVWCT de ligação a Fc, um não peptídeo GWTVFQKRLDGSV de controle específico ou nenhum peptídeo. Em seguida, 50 μL das amostras de anticorpo (concentração final de 833 ng/mL) foram adicionados e incubados durante 3 dias a 37º C. A capacidade da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio das células BxPC-3 foi fortemente inibida por 100 μg/mL de peptídeo DCAWHLGELVWCT de ligação a Fc (Figura 14). Estes dados indicam o envolvimento das interações de Fc: Fc na capacidade da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G com mutações realçadoras de hexamerização para induzir o agrupamento de DR5 na superfície da célula das células cancerosas e indução da apoptose.

Exemplo 16: Capacidade da combinação quimérica de anticorpo DR5-01 e anticorpos DR5-05 com a mutação realçadora da hexamerização de E430G para induzir o extermínio da célula cancerosa, em diferentes razões de combinação

[00387] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a capacidade da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G para induzir o extermínio das células BxPC-3 do câncer pancreático, quando combinados em razões diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G. As células foram coletadas através da tripsinização e passadas através de uma peneira celular. As células foram pelotizadas por centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em um meio de cultura em uma concentração de 0,5 x 10^5 células/mL. 100 μL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeados em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e incubados durante a noite a 37º C. 50 μL da amostra de anticorpo com razões diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G (indicado como Razão de DR5-01: DR5-05 de 100: 0, 90: 10, 80: 20, 70: 30, 60: 40, 50: 50, 40: 60, 30: 70, 20: 80, 10: 90 e 0: 100 nas concentrações finas da série de diluição serial variando de 0,06 a 20 μg/mL final em diluições de 5 vezes) foram adicionados e incubados durante 3 dias a 37º C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com estaurosporina 5 μM (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. A 20 μg/mL e 4 μg/mL de concentrações de anticorpo total, o extermínio foi igualmente eficaz em todos as razões de anticorpo testadas contendo ambos os anticorpos IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G. A 0,8 μg/mL e 0,16 μg/mL as concentrações de anticorpo totais, todas as razões de anticorpo testadas contendo ambos os anticorpos IgG1-DR5-01-

K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G induziram o extermínio (Figura 15).

Exemplo 17: Capacidade da combinação de anticorpos DR5-01 e anticorpos DR5-05 com mutação realçadora de hexamerização de E430G para induzir o extermínio da célula cancerosa, em diferentes razões de combinação

[00388] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a capacidade de combinação dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio da BxPC-3 pancreática e células HCT-15 do câncer de cólon, quando combinados em diferentes razões de anticorpos. Geralmente, os experimentos foram realizados como descrito no Exemplo 16. Em resumo, as células pré-fixadas (5.000 células por poço) foram incubadas durante 3 dias a 37º C em 150 μL em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços com razões diferentes de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G (indicado na Figura 16 como a Razão de DR5-01: DR5-05 de 100: 0, 98: 2, 96: 4, 94: 6, 92: 8, 90: 10, 50: 50, 10: 90, 8: 92, 6: 94, 4: 96, 2: 98 e 0: 100) nas concentrações de anticorpo final de 10 μg/mL para BxPC-3 e 20 μg/mL para HCT-15. A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. O extermínio foi igualmente eficaz e todas as razões de anticorpo testados contendo ambos os anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G (Figura 16).

Exemplo 18: A combinação de anticorpos DR5-01 + DR5-05 humanizados com a mutação realçadora de hexamerização E430G induz a citotoxicidade dependente de caspase

[00389] Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a citotoxicidade da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G na presença e ausência de um inibidor de caspase. As células de câncer pancreático PANC-1 e BxPC3 foram coletadas

por tripsinização e passadas através de uma peneira celular. As células foram pelotizadas por centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em um meio de cultura em uma concentração de 0,5 x 10^5 células/mL. 100 µL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e incubadas durante a noite a 37º C. 25 µL de inibidor de pan-caspase Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK, 5 µM de concentração final em 150 µL, Bachem, Cat nº 4026865,0005) foi adicionado às culturas celulares e incubadas por um hora a 37º C antes de adicionar 25 µL de amostra de anticorpo de uma série de preparação de anticorpo com diluição em série (faixa de 1 a 20 µg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes) e outra incubação durante 3 dias a 37º C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). TRAIL humano recombinante/APO-2L (eBioscience, Cat nº BMS356) foi usado em uma concentração final de 6 µg/mL. A viabilidade da culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. A combinação dos anticorpos humanizados com uma mutação realçadora de hexamerização IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi incapaz de reduzir a viabilidade de PANC-1 e células de câncer pancreático BxPC3 na presença do inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK, indicado que a combinação de IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G induziu a morte celular dependente de caspase programada (Figura 17). Esta foi também mostrada para ao ligando DR5 natural TRAIL.

Exemplo 19: Indução da morte celular na ligação da combinação de anticorpos DR5-01 e DR5-05 quiméricos nas células de câncer de cólon COLO 205, como avaliado por Anexina V/Iodeto de propídio e Tingimento de Caspase-3 Ativa

[00390] As cinéticas de indução da morte celular foram analisadas

através do tingimento duplo de Anexina V/Iodeto de propídio (PI) e tingimento de caspase-3 ativa. A anexina-V liga fosfatidilserina, isto é, exposta na superfície da célula depois do início da morte celular programada, que é um processo reversível. O PI é um corante que intercala no DNA e RNA de filamento duplo quando este entra nas células. Porque o PI não pode passar intacto no plasma e membranas nucleares, este não tingirá as células vivas, mas entra e tinge somente as células que têm a integridade de membrana diminuída. Devido a estas características, o tingimento duplo de Anexina V/PI pode ser aplicado para discriminar entre o início (Anexina V-positivo/PI-negativo) e a morte celular programada (Anexina V-positivo / PI-positivo) irreversível. A Caspase-3 é ativada tanto pelos caminhos induzidos pelo receptor de morte extrínseco quanto pelos mitocondriais intrínsecos. Portanto, a caspase-3 ativa também é um marcador para a iniciação da cascata de morte. A indução da morte celular na ligação da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi analisada nas células de câncer de cólon positivas para DR5, COLO 205. As células foram coletadas reunindo-se o sobrenadante de cultura contendo células não aderentes e células aderentes tripsinizadas. As células foram passadas através de uma peneira celular, pelotizadas pela centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em um meio de cultura em uma concentração de $0,2x10^6$ células/mL. 500 µL das suspensões de célula única (100.000 células por poço) foram semeadas em placas de cultura de fundo plano de 24 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 662160) e incubadas durante 16 horas a 37º C. 500 µL de amostra de anticorpo foram adicionadas (concentração final de anticorpo de 1 µg) e incubadas durante 5 horas ou 24 horas a 37º C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). As células foram lavadas uma vez com 250 µL 1x PBS. As células aderentes foram coletadas incubando-se com 100 µL de tripsina a 0,05 % durante 10 minutos a 37º C.

200 µL do meio foi adicionado às células tripsinizadas e as células foram transferidas a uma placa FACS de fundo redondo de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 650101) e reunidas com as células não aderentes. As células foram pelotizadas através da centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm, recolocadas em suspensão em 200 µL de PBS gelado e divididas em duas amostras de 100 µL na placa FACS de fundo redondo de 96 poços para o tingimento de Anexina V/PI e caspase-3 ativa, respectivamente.

[00391] O tingimento duplo de Anexina V / PI foi realizado usando o Kit I de Detecção Apoptose de FITC de Anexina V (BD Pharmingen, Cat nº 556547). As células foram lavadas uma vez com PBS gelado e incubadas em 50 µL de Solução de Tingimento de Anexina V/PI (Anexina V-FITC 1: 00 e PI 1: 25) durante 15 minutos a 4º C. As células foram lavadas com 100 µL de Tampão de Ligação, recolocadas em suspensão em 20 µL de Tampão de Ligação e a fluorescência foi medida em um iQue Screener (IntelliCyt) durante 1 hora. Os dados foram analisados e representados graficamente usando o suporte lógico GraphPad Prism.

[00392] O tingimento de caspase-3 ativa foi realizado usando o Kit de Apoptose PE de Caspase-3 Ativa (BD Pharmingen, Cat nº 550914). As células foram lavadas uma vez com PBS gelado, recolocadas em suspensão em 100 µL de Solução de Fixação e Permeabilização Cytofix/Cytoperm e incubadas durante 20 minutos em gelo. As células foram pelotizadas na temperatura ambiente, lavadas duas vezes com 100 µL de 1x Tampão de Perm/Lavagem e recolocadas em suspensão em 100 µL de PE de Coelho Anti-Caspase-3 Ativa (1: 10) para uma incubação de 30 minutos na temperatura ambiente. As células foram pelotizadas na temperatura ambiente, lavadas uma vez com 100 µL de 1x Tampão de Perm/Lavagem e recolocadas em suspensão em 20 µL de 1x Tampão de Perm/Lavagem. A fluorescência foi medida em um **iQue Screener**. Os dados foram analisados e analisados graficamente usando o suporte lógico GraphPad Prism.

[00393] A Figura 18 mostra que, depois de 5 horas de incubação, a combinação dos anticorpos quiméricos de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G eficientemente induziu os estágios precoces da morte celular como indicado por um aumento na porcentagem de Anexina V-positivo/PI-negativo (A) e as células positivas para Caspase-3 Ativa (B), se comparado ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo. A porcentagem de Anexina V-positivo/PI-negativo e as células positivas de Caspase-3 Ativa foi mais alta nas células tratadas com a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G se comparado à combinação dos anticorpos DR5 sem a mutação de E430G (IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L) ou qualquer um dos anticorpos únicos. No tempo de hora 5, a porcentagem das células duplo positivo para AnexinaV/PI foi comparável aos níveis de fundo em todas as amostras (C).

[00394] Depois da incubação de 24 horas, a porcentagem das células duplo-positivas de Anexina V/PI (D) foi realçada nas amostras tratadas com IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, indicando que as células entraram nos estágios irreversíveis de morte celular. Também neste estágio, o efeito da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi mais forte (maior que o aumento na porcentagem das células duplo positivas de Anexina V/PI (E)) do que nas amostras tratadas com uma combinação de anticorpos DR5 sem a mutação de E430G (IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L) ou qualquer um dos anticorpos simples. No mesmo ponto de tempo, a porcentagem de células positivas de Caspase 3 Ativa foi mais alta nas células tratadas com IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G.

[00395] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G induz os estágios de morte tanto precoce quanto tardio nas células de câncer de cólon COLO 205 e o faz de maneira mais eficaz do que a combinação dos anticorpos sem a mutação

realçadora de hexamerização de E430G.

Exemplo 20: Ativação de Caspase-3 e -7 na ligação da combinação de anticorpos DR5-01 e DR5-05 quiméricos com a mutação realçadora de hexamerização nas células de câncer de cólon COLO 205

[00396] No Exemplo 19, foi descrito que a incubação com a combinação de anticorpos DR5 quiméricos IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G induziu a ativação da caspase-3 nas células de câncer de cólon COLO 205. A porcentagem de células positivas para caspase-3 ativa foi mais alta depois de 5 horas do que depois 24 horas de incubação com a combinação de anticorpo. Neste exemplo, a ativação da Caspase-3/7 foi medida no momento usando o ensaio de Caspase-Glo 3/7 (Promega, Cat nº G8091), no qual um substrato com o motivo de reconhecimento da Caspase-3/7 DEVD libera aminoluciferina, um substrato de luciferase, na clivagem. As células foram coletadas reunindo-se o sobrenadante de cultura contendo as células não aderentes e COLO 205 aderentes tripnizadas. As células foram passadas através de uma peneira celular, pelotizadas através da centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão no meio de cultura em uma concentração de $0,8x10^5$ células/mL. 25 µL das suspensões de célula única (2.000 células por poço) foram semeadas em placas de cultura de 384 poços (Perkin Elmer, Cat nº 6007680) e incubadas durante 16 horas a 37º C. 25 µL de amostra de anticorpo foram adicionadas (concentração final de anticorpo de 1 µg) e incubados durante 1, 2, 5 e 24 horas a 37º C. as placas foram removidas da incubadora para deixar a temperatura de diminuição na temperatura ambiente. As células foram pelotizadas através da centrifugação por três minutos a 300 g. 25 µL de sobrenadante foram removidos e recolocados em 25 µL de Substrato de Caspase-Glo 3/7. Depois de misturar por agitação por um minuto a 500 rpm, as placas foram incubadas por uma hora na temperatura ambiente. A luminescência foi medida em um Leitor de Multi-Rótulos EnVision

(PerkinElmer).

[00397] A Figura 19 mostra que no tempo do decorrer de 1, 2 a 5 horas, a ativação da caspase-3/7 foi induzida pelas combinações de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L e para anticorpo DR5 biespecífico BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G. Depois de 24 horas, a ativação da caspase-3/7 foi quase reduzida aos níveis de linha de base para todos os testes de anticorpos DR5. Depois de 1 hora, a ativação da caspase-3/7 já foi observada nas células que foram tratadas com a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, ao passo que nenhuma ativação de caspase-3/7 foi observada nas células que foram tratadas com a combinação de IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L sem a mutação realçadora da hexamerização. Similarmente, a 2 e 5 horas, a ativação da caspase-3/7 induzida pela combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi mais forte do que para a combinação de IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L. Estes dados indicam que a combinação de anticorpos DR5 quimérico com a mutação realçadora de hexamerização IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G induziram a ativação da Caspase-3/7 mais rápida e mais potente do que a combinação dos anticorpos sem a mutação realçadora de hexamerização.

Exemplo 21: A potência da combinação de anticorpo do DR5-01 e DR5-05 quiméricos com a mutação realçadora de hexamerização de E430G é independente da presença de um reticulador de Fc secundário

[00398] Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a capacidade da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G na ausência e presença de um reticulador de anticorpo secundário para induzir o extermínio de COLO 205 colorretal e células de câncer pancreático BxPC-3 e PANC-1. Para comparação, dois anticorpos DR5 que são conhecidos mostrar o extermínio realçado na

presença de um reticulador de anticorpo secundário, IgG1-CONA e IgG1-chTRA8-F405L, foram testados nas mesmas configurações. As células foram coletadas por tripsinização e passadas através de uma peneira celular. As células foram pelotizadas por centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em um meio de cultura em uma concentração de 0,5 x 10^5 células/mL. 100 µL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e incubadas durante a noite a 37º C. O sobrenadante das células aderentes foi recolocado nas amostras de anticorpos de 150 µl (concentração final de 10 µg/ml) na ausência ou presença de fragmentos de $F(ab')_2$ de um anticorpo de cabra IgG anti-humano (1/150; Jackson ImmunoResearch; Cat nº 109-006-098) e incubado durante 3 dias a 37º C. Como um controle positivo para o extermínio celular, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. A combinação dos anticorpos IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G induziram o extermínio significante se comparado ao controle negativo de COLO 205, células cancerosas BxPC-3 e PANC-1, ambas na presença ou ausência de um reticulador de Fc (Figura 20). Em contraste, os anticorpos DR5 IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-chTRA8-F405L não induzem o extermínio de célula alvo na ausência de um reticulador de Fc. A reticulação de Fc induziu o extermínio por IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-chTRA8-F405L em células COLO 205 e BxPC-3, embora com uma potência significantemente menor do que a combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G na presença ou ausência de reticulador. Estes dados indicam que o extermínio de células cancerosas COLO 205, BxPC-3 e PANC-1 através da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G é independente da

presença de um reticulador de Fc secundário e que este extermínio independente de reticulador é mais eficiente do que para o IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-chTRA8-F405L ligado em cruzado com o Fc.

Exemplo 22: Introdução da mutação de K409R em IgG1-hDR5-01-430G e a mutação de F405L em IgG1-hDR5-05-E430G não tem nenhum efeito têm nenhum efeito na potência da combinação dos anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G

[00399] Em muitos dos experimentos descritos neste pedido, os anticorpos anti-DR5 IgG1-01 e IgG1-05 contêm no domínio Fc de IgG, a mutação de K409R e F405L (no índice de numeração EU), respectivamente. Estas mutações permitem a geração de anticorpos de DR5 biespecíficos através da reação de troca de braço de Fab entre IgG1-01-K409R e IgG1-05-F405L sob condições de redução controladas como descrito na WO2011/131746. Sem a troca do braço de Fab, os anticorpos IgG1 humanos que carregam as mutações de K409R e F405L são pensados apresentar as mesmas características funcionais como o IgG1 humano do tipo selvagem (Labrijn *et al*., Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de março de 2013;110(13): 5145-50). Aqui, nós mostramos que a presença das mutações de K409R ou F405L não têm nenhum efeito na capacidade da combinação dos anticorpos parentais IgG1-01 e IgG1-05 para induzir a morte celular nas células positivas para DR5 de tumores *in vitro*. Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a capacidade da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G com a capacidade da combinação de anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio das células de câncer pancreático BxPC-3. O ensaio de viabilidade na BxPC-3 foi realizado como descrito no Exemplo 11 com um série de anticorpos diluída em série variando de 0,001 a 20.000 ng/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes. A linha celular de câncer pancreático BxPC-3 mostrou curvas de viabilidade similar

depois da incubação com a combinação dos anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G como com a combinação dos anticorpos humanizados IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (Figura 21). Estes dados indicam que as mutações K409R e F405L não tiveram nenhum efeito na potência da combinação dos anticorpos DR5-01 e DR5-05 humanizados com mutação realçadora de hexamerização E430G .

Exemplo 23: Anticorpo quimérico biespecífico IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G induz o extermínio de células tumorais positivas para DR5

[00400] Um anticorpo biespecífico alvejando dois diferentes epítopos de DR5 foi gerado pela troca do braço de Fab entre os anticorpos quiméricos IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G como descrito no Exemplo 1. Um ensaio de viabilidade foi realizado como descrito no Exemplo 11 para testar a capacidade de 10 μg/ml do BsAb quimérico IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G de induzir o extermínio das células cancerosas de diferentes origens tissulares (linhagens de célula de câncer colorretal COLO 205, câncer de pele A375, câncer pulmonar SK-MES-1, câncer pancreático BxPC-3 e câncer gástrico SNU-5). Para todas as linhagens de célula testadas, a porcentagem de células viáveis foi significantemente menor quando incubadas com 10 μg/ml do anticorpo BsAb quimérico IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G se comparado ao não anticorpo de controle negativo de ligação de alvo IgG1-b12 (Figura 22). Estes dados indicam que o anticorpo de anti-DR5xDR5' biespecífico com a mutação realçadora de hexamerização E430G induziu o extermínio das células cancerosas de diferentes origens, incluindo câncer do cólon, pancreático, gástrico, de pulmão e de pele, sem a necessidade de um reticulador secundário.

Exemplo 24: A potência do BsAb quimérico IgG1-DR5-01-K409R-E430G

x DR5-05-F405L-E430G é independente da presença de um reticulador de Fc secundário

[00401] Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a potência do BsAb quimérico IgG1-DR5-01-K409R-E430G x IgG1-DR5-05-F405L-E430G na ausência e presença de um anticorpo secundário reticulador para induzir o extermínio de células de câncer pancreático BxPC-3 e de cólon COLO 205 como descrito no Exemplo 21. Para comparação, dois anticorpos de DR5 que são conhecidos mostrar o extermínio realçado na presença de um anticorpo secundário reticulador, IgG1-CONA e IgG1-chTRA8-F405L, foram testados no mesmo ajuste. O BsAb quimérico IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G mostrou um extermínio significante se comparado ao controle negativo de células cancerosas COLO 205 e BxPC-3, ambas na presença ou ausência de um reticulador de Fc (Figura 23). Ao contrário, os anticorpos DR5 IgG1-DR5-CONA e IgG1-DR5-chTRA8-F405L induziram somente o extermínio na presença do reticulador de Fc.

Exemplo 25: Indução da morte celular na ligação do BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G nas Células de câncer de cólon COLO 205, como avaliado pelo tingimento de Anexina V/Iodeto de propídio e Caspase-3 Ativa

[00402] As cinéticas de indução da morte celular por 1 μg/mL de BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G em células COLO 205 foram analisadas por duplo tingimento de Anexina V / Iodeto de propídio (PI) e caspase-3 ativa como descrito no Exemplo 19.

[00403] A Figura 24 mostra que, depois de 5 horas de incubação, BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430GxDR5-05-F405L-E430G eficientemente induziu os estágios precoces da morte celular como indicado por um aumento na porcentagem de Anexina V-positivo/ PI-negativo (A) e Células positivas para a caspase-3 ativa (B), comparada ao anticorpo de controle negativo IgG1-b12. A porcentagem de Anexina V-positivo/PI-negativo e células de Caspase-3

Ativa positivas foi mais alta nas células que foram tratadas com BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430GxDR5-05-F405L-E430G se comparado ao anticorpo biespecífico sem a mutação de E430G (BsAb IgG1-DR5-01-K409RxDR5-05-F405L) ou qualquer um dos anticorpos monoespecífico. No ponto de tempo de 5 horas, a porcentagem de células duplo positivas de AnexinaV/PI foi comparável aos níveis de fundo em todas as amostras (C).

[00404] Depois de 24 horas incubação, a porcentagem de células duplo-positivas de Anexina V/PI (D) foi realçada nas amostras tratadas com BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430GxDR5-05-F405L-E430G, indicando que as células entraram nos estágios irreversíveis de morte celular. Também neste estágio, o efeito de BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430GxDR5-05-F405L-E430G foi mais forte (maior que o aumento na porcentagem das células duplo-positivas de Anexina V/PI (E) do que nas amostras tratadas com o anticorpo biespecífico sem a mutação de E430G (BsAb IgG1-DR5-01-K409R x DR5-05-F405L) ou qualquer um dos anticorpos monoespecífico. Ao mesmo ponto de tempo, a porcentagem de células positivas para Caspase 3 Ativa foi mais alta nas células tratadas com BsAB IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G.

[00405] Estes dados indicam que BsAB IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G induz tanto os estágios precoces e tardios da morte celular nas Células de câncer de cólon COLO 205 e faz isso de maneira mais eficaz do que o anticorpo biespecífico sem a mutação realçadora de hexamerização de E430G.

Exemplo 26: Eficácia *in vivo* das variantes de anticorpos DR5-01 e DR5-05 com e sem uma mutação realçadora da hexamerização em um modelo de xenoenxerto de câncer de cólon COLO 205 subcutâneo

[00406] A eficácia antitumoral *in vivo* dos anticorpos anti-DR5 diferentes e a combinação de anticorpos DR5-01 + DR5-05 com a mutação realçadora de hexamerização foi avaliada em um modelo subcutâneo com

células de câncer do cólon humano COLO 205. No dia 0, as células foram coletadas reunindo-se o sobrenadante de cultura contendo células não aderentes e células aderentes tripsinizadas. $3x10^6$ células foram injetadas em um volume de 200 µL PBS no flanco de camundongos SCID fêmeas de 6 a 11 semanas de idade (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). Todos os experimentos e manuseios animais foram aprovados pelas autoridades e pelas autoridades locais e foram conduzidos de acordo com todas as leis e diretrizes internacionais, nacionais e locais aplicáveis. O desenvolvimento do tumor foi monitorado pelo menos duas vezes por semana através da medição com um compasso de calibre (PLEXX) como 0,52 x (comprimento) x (largura)^2. Os tumores foram medidos até um volume de tumor da ponta de extremidade de 1.500 mm^3, até os tumores mostrarem ulcerações, até sinais clínicos sérios serem observados ou até o crescimento tumoral bloquear os movimentos do camundongo. No dia 6, o volume de tumor médio foi de ~200 mm^3 e os camundongos foram sortidos em grupos com uma variação igual ao tamanho do tumor (Tabela 2 abaixo). Os camundongos foram tratados através da injeção intraperitoneal (i.p.) de 100 µg de anticorpo em 200 µl de PBS no dia 6 e 13 (5 mg/kg por dose). Para checar quanto a administração de anticorpo correta, as amostras de sangue foram obtidas para a determinação de soro de IgG três dias depois da primeira dose. Três camundongos individuais não tiveram um nível no plasma de IgG humano detectável e foram excluídos da análise (ver a Tabela 2 abaixo). Para os outros camundongos, as concentrações de anticorpo plasma humano foram de acordo com as expectativas quando assumindo um modelo de 2 compartimentos com Vcen = 50 mL/kg, Vs = 100 mL/kg e uma meia vida de eliminação de 11,6 dias (dados não mostrados). Os tumores foram medidos até 16 semanas depois da inoculação do tumor.

Tabela 2: Grupos e dosagem de tratamento

# camundongos	# analisados	Anticorpo	Dose total de anticorpo	Dia da dosagem depois da inoculação de tumor
8	7	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (50 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (50 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
7	7	IgG1-DR5-05-F405L (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
8	8	IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
8	8	IgG1-CONA (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
8	7	BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
8	8	BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13
8	7	IgG1-b12 (100 μg)	100 μg (5 mg/kg)	6, 13

[00407] A Figura 25A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento em tempo. A Figura 25B representa os volumes de tumor médio no dia 23 depois da inoculação do tumor, quando todos os grupos ainda estavam intactos. Todas as amostras de anticorpo anti-DR5 inibiram o crescimento tumoral significantemente se comparado ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo (análise ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguido pelo teste de comparação múltiplo de Dunn no dia 23: $p< 0,0001$). A abrogação de tumor completa foi observada para a combinação de anticorpos DR5-01 + DR5-05 com uma mutação realçadora de hexamerização (IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G), para os anticorpos biespecíficos com e sem a mutação realçadora de hexamerização (BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L e BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G) e para os anticorpos anti-DR5 com uma mutação realçadora de hexamerização (IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G). IgG1-CONA e IgG1-DR5-05-F405L sem mutação realçadora de hexamerização inibiram fortemente o crescimento tumoral se comparado ao IgG1-b12, mas não resultou na abrogação tumoral completa.

[00408] A Figura 25C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão de tumor, com um ajuste de corte em um volume de tumor >750 mm^3. Comparado aos camundongos tratados com anticorpo IgG1-b12 de controle negativo, a excrescência do tumor foi significantemente atrasada em todos os grupos tratados com anticorpos anti-DR5 (análise de Mantel-Cox no

corte de tamanho do tumor de 750 mm^3: p< 0,001). No final do estudo (dia 112), o grupo de camundongos tratados com a combinação de anticorpos DR5-01 + DR5-05 com a mutação realçadora de hexamerização (IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G) mostrou os camundongos menos significantes com uma excrescência tumoral do que o grupo de conatumumab (teste de contingência exata de Fisher p<0,01).

[00409] Estes dados mostram que a introdução da mutação de E430G realçadora de hexamerização em IgG1-DR5-05-F405L resultou na inibição de tumor realçada no modelo de tumor de câncer do cólon subcutâneos COLO 205 comparada ao IgG1-DR5-05-F405L sem a mutação realçadora de hexamerização. Os anticorpos tanto DR5-01 quanto DR5-05 com mutação realçadora de hexamerização (IgG1-DR5-01-K409R-E430G e IgG1-DR5-05-F405L-E430G), os anticorpos biespecíficos com e sem mutação realçadora de hexamerização (BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L e BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G) e a combinação de anticorpos com mutação realçadora de hexamerização (IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G) mostraram uma melhor inibição tumoral como IgG1-CONA e IgG1-DR5-05-F405L sem a mutação realçadora de hexamerização.

Exemplo 27: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto de câncer subcutâneos no cólon COLO 205

[00410] A eficácia antitumoral *in vivo* das doses diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi avaliada e comparada a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA no modelo de xenoenxerto de câncer do cólon humano COLO 205 subcutâneo. A inoculação da célula de tumor, o manuseio dos camundongos, as medições de excrescência tumoral e a determinação do ponto final foram realizados como descrito no Exemplo 26. No dia 10, o volume de tumor médio foi de ~400

mm^3 e os camundongos foram sortidos em grupos com variações de tamanho de tumor iguais (Tabela 3 abaixo). Os camundongos foram tratados através da injeção intravenosa (i.v.) de 40 μg (2 mg/kg), 10 μg (0,5 mg/kg) ou 2 μg (0,1 mg/kg) de anticorpo em 100 μL de PBS no dia 10. Os camundongos no grupo de controle foram tratados com 40 μg (2 mg/kg) de IgG1-b12. Os tumores foram medidos até 17 semanas depois da inoculação tumoral.

Tabela 3: Grupos e dosagem do tratamento

# camundongos	Anticorpo	Dose total de anticorpo	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 μg)	40 μg (2 mg/kg)	10
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 μg)	10 μg (0,5 mg/kg)	10
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 μg)	2 μg (0,1 mg/kg)	10
8	IgG1-CONA (40 μg)	40 μg (2 mg/kg)	10
8	IgG1-CONA (10 μg)	10 μg (0,5 mg/kg)	10
8	IgG1-CONA (0,1 μg)	2 μg (0,1 mg/kg)	10
8	IgG1-b12 (40 μg)	40 μg (2 mg/kg)	10

[00411] A Figura 26A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. O tratamento com uma dose simples de 0,5 mg/kg ou 2 mg/kg da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G resultou na regressão completa do tumor até o estudo ser interrompido no dia 126. O tratamento com 0,5 mg/kg e 2 mg/kg de IgG1-CONA também induziu a regressão do tumor, mas a regressão foi incompleta com uma excrescência do tumor recorrente em todos os camundongos ou quase todos os camundongos (7/8), respectivamente. A 0,1 mg/kg, nem o IgG1-CONA nem a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G mostraram atividade antitumor. A Figura 26B mostra que no dia 16 depois da inoculação do tumor, a inibição do tumor em 2 mg/kg e 0,5 mg/kg de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significantemente mais bem comparada a uma dose equivalente de IgG1-CONA (teste t não emparelhado).

[00412] A Figura 26C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão tumoral, com uma configuração de corte em um volume de tumor

>500 mm^3. Em uma dose de 0,5 mg/kg e 2 mg/kg, a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G e IgG1-CONA inibiu significantemente a progressão do crescimento tumoral se comparado ao anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (análise de Mantel-Cox p<0,001 no tamanho do corte de tumor de 500 mm^3). Em uma dose de 0,5 mg/kg, a inibição da progressão do crescimento do tumor foi significantemente melhor para a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G a uma dose equivalente de IgG1-CONA.

[00413] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G tem uma eficácia antitumoral mais forte se comparada ao IgG1-CONA, visto que dosada a 2 mg/kg a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G significantemente reduziu a carga tumoral no dia 16 se comparada ao IgG1-CONA e a 0,5 mg/kg a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G significantemente reduziu a carga de tumor no dia 16 e prolongou o tempo de sobrevivência livre da progressão (o tamanho do corte do tumor de 500 mm^3) se comparada ao IgG1-CONA.

Exemplo 28: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto de câncer pancreático de BxPC-3 subcutâneo

[00414] As eficácias antitumorais *in vivo* das doses diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foram avaliadas e comparadas a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA-F405L no modelo de xenoenxerto subcutâneo do câncer pancreático humano de BxPC-3. No dia 0, as células aderentes foram coletadas através da tripsinização. 5 x 10^6 células foram injetadas em um volume de 100 µL de PBS no flanco de camundongos SCID fêmeas de 6 a 11 semanas de idade (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). O manuseio dos camundongos, as medições da

excrescência do tumor e a determinação do ponto final foram realizadas como descrito no Exemplo 26. No dia 10, o volume de tumor médio foi de ~250 mm^3 e os camundongos foram sortidos em grupos com uma variação de tamanho do tumor igual (Tabela 4 abaixo). Os camundongos foram tratados através da injeção i.v. de 200 μg (10 mg/kg), 40 μg (2 mg/kg) ou 10 μg (0,5 mg/kg) de anticorpo em 200 μL de PBS no dia 20 e 28. Os camundongos no grupo de controle foram tratados com 200 μg (10 mg/kg) de IgG1-b12. Para checar a administração do anticorpo correto, as amostras de sangue foram obtidas para a determinação de IgG no soro depois de uma semana da dosagem. Os tumores foram medidos até 10 semanas depois da inoculação tumoral.

Tabela 4: Grupos de tratamentos e dosagem

# camun-dongos	Anticorpo	Anticorpo total por dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 μg)	200 μg (10 mg/kg)	20, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 μg)	40 μg (2 mg/kg)	20, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 μg)	10 μg (0,5 mg/kg)	20, 28
8	IgG1-CONA-F405L (40 μg)	200 μg (10 mg/kg)	20, 28
8	IgG1-CONA-F405L (10 μg)	40 μg (2 mg/kg)	20, 28
8	IgG1-CONA-F405L (0,1 μg)	10 μg (0,5 mg/kg)	20, 28
8	IgG1-b12 (40 μg)	200 μg (10 mg/kg)	20, 28

[00415] A Figura 27A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. Todas as doses da combinação testada de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiram o crescimento de tumor se comparado ao anticorpo de controle negativo IgG1-b12, ao passo que os grupos de tratamento IgG1-CONA-F405L não inibiram. A Figura 27B mostra que no dia 48, depois da inoculação de tumor, inibição do crescimento do tumor pela combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significantemente melhor do que as doses equivalentes de IgG1-CONA-F405L (teste t não emparelhado, $p < 0,05$).

[00416] A Figura 27C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão tumoral, com um ajuste de corte em um volume de tumor >500

mm^3. A combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G significantemente inibiu a progressão do crescimento tumoral se comparado ao anticorpo de controle negativo IgG1-b12 e comparado ao IgG1-CONA-F405L (a análise de Mantel-Cox no tamanho do corte de tumor de 500 mm^3: $p<0,001$).

[00417] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiu o crescimento do tumor em doses diferentes (0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg) e que a eficácia antitumoral foi significantemente melhor do que para as doses equivalentes de IgG1-CONA-F405L em um modelo de xenoenxerto do câncer pancreático BxPC-3 humano *in vivo*.

Exemplo 29: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer de pele A375

[00418] A eficácia antitumoral *in vivo* das doses diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi avaliada e comparada a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA-F405L no modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer de pele humano A375. No dia 0, as células aderentes foram coletadas através da tripsinização. 5 x 10^6 células foram injetadas em um volume de 100 µL PBS no flanco de camundongos SCID fêmeas com 6 a 11 semanas de idade (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). O manuseio dos camundongos, medição da excrescência do tumor e a determinação do ponto final foram realizados como descrito no Exemplo 26. No dia 19, o volume de tumor médio foi de ~250 mm^3 e os camundongos foram sortidos em grupos com uma variação de tamanho do tumor igual (Tabela 5 abaixo). Os camundongos foram tratados através da injeção i.v. de 200 µg (10 mg/kg), 40 µg (2 mg/kg) ou 10 µg (0,5 mg/kg) de anticorpo em 200 µL de PBS no dia 19 e 26. Os camundongos no grupo de controle foram tratados com 200 µg (10 mg/kg) de IgG1-b12. Para checar a administração de

anticorpo correta, as amostras de sangue foram obtidas para a determinação de IgG no soro uma semana depois da dosagem. Os volumes tumorais foram analisados até 7 semanas depois da inoculação do tumor.

Tabela 5: Grupos de tratamento e dosagem

# camundongos	Anticorpo	Total anticorpo dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 µg)	200 µg (10 mg/kg)	19, 26
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 µg)	40 µg (2 mg/kg)	19, 26
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	19, 26
8	IgG1-CONA-F405L (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	19, 26
8	IgG1-CONA-F405L (10 µg)	40 µg (2 mg/kg)	19, 26
8	IgG1-CONA-F405L (0,1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	19, 26
8	IgG1-b12 (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	19, 26

[00419] A Figura 28A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. Todas as doses de teste da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiram o crescimento tumoral se comparado ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo, ao passo que os grupos de tratamento IgG1-CONA-F405L não inibiram. A Figura 28B mostra que no dia 29, depois da inoculação do tumor, o tamanho médio do tumor em camundongos tratados com a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi menor do que em camundongos tratados com IgG1-b12 ($p<0,05$ para todos os níveis de dosagem, ANOVA de uma via com correção de Dunnet para as múltiplas comparações) e que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significantemente mais potente do que IgG1-CONA-F405L (teste de Mann Whitney, $p <0,05$) em doses equivalentes

[00420] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiu o crescimento do tumor em doses diferentes (0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg) e que a eficácia antitumoral foi significantemente melhor do que para as doses equivalentes de IgG1-CONA-F405L em um modelo de xenoenxerto *in vivo* de câncer de pele humano A375.

Exemplo 30: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer de cólon HCT-15

[00421] A eficácia antitumoral *in vivo* das doses diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi avaliada e comparada a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA no modelo de xenoenxerto subcutâneo do câncer de cólon humano HCT-15 na CrownBiosciences, Taicang, China. As células foram mantidas *in vitro* como uma cultura de monocamada em um meio de RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro bovino fetal a 37º C em uma atmosfera de 5 % de CO_2 em ar. As células aderentes em uma fase de crescimento exponencial foram coletadas através do tratamento com tripsina-EDTA. 5 x 10^6 células foram injetadas em um volume de 100 µL de PBS no flanco de camundongos nus BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade (Shanghai Laboratory Animal Center). O cuidado e o uso de animais durante o estudo foram conduzidos de acordo com as regulações da associação para a Avaliação e Acreditação do Cuidado de Animal de Laboratório (AAALAC). Os volumes de tumor foram medidos duas vezes por semana em duas dimensões usando um compasso de calibre e o volume foi expressado em mm^3 usando a fórmula: V = 0,5 a x b2 onde a e b são os diâmetros longos e curtos do tumor, respectivamente. Onze dias depois da inoculação do tumor, a média do tamanho do tumor atingiu 186 mm^3 e os camundongos foram designados em grupos usando um projeto de bloco aleatorizado e os tratamentos foram iniciados. Os camundongos foram tratados duas vezes de acordo com um regime Q7D através da injeção i.v. de 200 µg (10 mg/kg), 40 µg (2 mg/kg) ou 10 µg (0,5 mg/kg) de anticorpo em 10 µL de PBS por g de peso corporal. Os camundongos no grupo de controle foram tratados em paralela com 200 µg (10 mg/kg) de IgG1-b12. Depois da inoculação do tumor, o bem-estar dos animais foi checado diariamente e os

volumes de tumor foram medidos duas vezes semanalmente.

Tabela 6: Grupos de tratamento e dosagem, Exemplo 30

# camundongos	# analisada	Anticorpo	Total anticorpo dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 µg)	200 µg (10 mg/kg)	11, 18
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 µg)	40 µg (2 mg/kg)	11, 18
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	11, 18
8	8	IgG1-CONA (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	11, 18
8	8	IgG1-CONA (10 µg)	40 µg (2 mg/kg)	11, 18
8	8	IgG1-CONA (0,1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	11, 18
8	8	IgG1-b12 (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	11, 18

[00422] A Figura 29A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. Todas as doses da combinação de anticorpo testadas de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiram o crescimento tumoral se comparado ao anticorpo de controle negativo IgG1-b12, ao passo que IgG1-CONA não inibiu. A Figura 29B mostra que no dia 17 depois do início do tratamento, a inibição do crescimento tumoral através da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significantemente melhor do que as doses equivalentes IgG1-CONA (Teste t não emparelhado, $p < 0,05$).

[00423] A Figura 29C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão do tumor, com um ajuste de corte em um volume de tumor >500 mm^3. A combinação IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G significantemente inibiu a progressão do crescimento tumoral se comparada ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo e comparada a uma dose equivalente de IgG1-CONA (análise Mantel-Cox no tamanho de corte do tumor de 500 mm^3: $p<0,001$).

[00424] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiu o crescimento tumoral em diferentes doses (0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg) e que a eficácia antitumoral foi significantemente melhor do que para as doses equivalentes de

IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto *in vivo* com células de câncer de cólon humanas HCT-15.

Exemplo 31: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer do cólon de SW480

[00425] A eficácia antitumoral *in vivo* das diferentes doses de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi avaliada e comparada a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA no modelo de xenoenxerto subcutâneos de câncer de cólon humano de SW480 na CrownBiosciences, Taicang, China. As células foram mantidas *in vitro* como uma cultura de monocamada em um meio L-15 suplementado com 10 % de soro bovino fetal a 37º C em 100 % de ar. As células aderentes em uma fase de crescimento exponencial foram coletadas através do tratamento com tripsina-EDTA. $1x10^7$ células foram injetadas em um volume de 200 µL de PBS com Matrigel (1:1) no flanco de camundongos NOD/SCID fêmeas com 6 a 8 semanas de idade (Beijing HFK Bioscience). O manuseio dos camundongos e as medições do volume tumoral foram realizados como descrito no Exemplo 30. Dez dias depois da inoculação do tumor, a média do tamanho do tumor atingiu 175 mm^3 e os camundongos foram designados em grupos usando um projeto de bloco aleatorizado e os tratamentos foram iniciados. Os camundongos foram tratados duas vezes de acordo com um regime Q7D através da injeção i.v de 200 µg (10 mg/kg), 40 µg (2 mg/kg) ou 10 µg (0,5 mg/kg) de anticorpo em 10 µL de PBS por g de peso corporal. Os camundongos no grupo de controle foram tratados em paralelo com 200 µg (10 mg/kg) IgG1-b12. Depois da inoculação do tumor, o bem-estar dos animais foi checado diariamente e os volumes tumorais foram medidos duas vezes por semana.

Tabela 7: Grupo de tratamentos e dosagem, Exemplo 31

# camun-dongos	# analisados	Anticorpo	Anticorpo total por dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor

# camundongos	# analisados	Anticorpo	Anticorpo total por dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 μg)	200 μg (10 mg/kg)	10, 17
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 μg)	40 μg (2 mg/kg)	10, 17
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 μg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 μg)	10 μg (0,5 mg/kg)	10, 17
8	8	IgG1-CONA (40 μg)	200 μg (10 mg/kg)	10, 17
8	8	IgG1-CONA (10 μg)	40 μg (2 mg/kg)	10, 17
8	8	IgG1-CONA (0,1 μg)	10 μg (0,5 mg/kg)	10, 17
8	8	IgG1-b12 (40 μg)	200 μg (10 mg/kg)	10, 17

[00426] A Figura 30A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. Todas as doses da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G testadas inibiram o crescimento tumoral comparadas ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo (10 mg/kg $p<0,0001$; 2 mg/kg $p<0,001$; 0,5 mg/kg $p<0,05$). Os grupos de tratamento de IgG1-CONA somente foram melhores do que o IgG1-b12 nas doses mais altas (10 mg/kg e 2 mg/kg $p<0,01$), mas não a 0,5 mg/kg. A Figura 30B mostra que no dia 28 depois do início do tratamento, a inibição do crescimento tumoral através da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significantemente melhor do que as doses equivalentes de IgG1-CONA a 10 mg/kg e 0,5 mg/kg (Teste t não emparelhado, $p <0,05$).

[00427] A Figura 30C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier de progressão do tumor, com um corte ajustado em uma volume de tumor >500 mm^3. A combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G dosada a 10 mg/kg inibiu significantemente a progressão do crescimento tumoral se comparada ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo e se comparada a uma dose equivalente de IgG1-CONA (análise de Mantel-Cox no tamanho do corte de tumor de 500 mm^3: $p<0,001$.

[00428] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiu o crescimento tumoral em doses diferentes (0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg) e que a eficácia antitumoral para as doses de 10 mg/kg e 0,5 mg/kg foi significantemente

melhor do que para as doses equivalentes de IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto *in vivo* de câncer de cólon humano da SW480.

Exemplo 32: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneos de câncer gástrico da SNU-5

[00429] A eficácia antitumoral *in vivo* das doses diferentes de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi avaliada e comparada a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA no modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer gástrico humano da SNU-5 na CrownBiosciences, Taicang, China. As células foram mantidas *in vitro* como uma cultura de suspensão em um meio de IMDM suplementado com 20 % de soro bovino fetal a 37º C em uma atmosfera de 5 % de CO_2 no ar. As células em uma fase de crescimento exponencial foram coletadas e 1 x 10^7 células foram injetadas em um volume de 200 µL de PBS com Matrigel (1: 1) no flanco de camundongos CB17/SCID fêmeas com 6 a 8 semanas de idade (Beijing HFK Bioscience). O manuseio dos camundongos e as medições do volume tumoral foram realizados como descrito no Exemplo 30. Oito dias depois da inoculação do tumor o tamanho médio do tumor atingiu 169 mm^3 e os camundongos foram designados em grupos usando um projeto de bloco aleatorizado e os tratamentos foram iniciados. Os camundongos foram tratados duas vezes de acordo com um regime de Q7D através da injeção i.v. de 200 µg (10 mg/kg), 40 µg (2 mg/kg) ou 10 µg (0,5 mg/kg) anticorpo em 10 µL PBS por g de peso corporal. Os camundongos no grupo de controle foram tratados em paralelo com 200 µg (10 mg/kg) IgG1-b12. Depois da inoculação tumoral, o bem-estar dos animais foi diariamente checado e os volumes tumorais foram medidos duas vezes por semana.

Tabela 8: Grupo de tratamentos e dosagem, Exemplo 32

# camun-dongos	# analisados	Anticorpo	Anticorpo total por dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 µg)	200 µg (10 mg/kg)	8, 15

8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 µg)	40 µg (2 mg/kg)	8, 15
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	8, 15
8	8	IgG1-CONA (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	8, 15
8	8	IgG1-CONA (10 µg)	40 µg (2 mg/kg)	8, 15
8	8	IgG1-CONA (0,1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	8, 15
8	8	IgG1-b12 (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	8, 15

[00430] A Figura 31A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. Todas as doses testadas da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiram o crescimento tumoral comparadas ao anticorpo IgG1-b12de controle negativo. Nas doses de 2 mg/kg e 10 mg/kg, a combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G resultou na regressão completa do tumor que durou pelo tempo de estudo completo (7 semanas depois do início do tratamento). A Figura 31B mostra que no dia 23 depois do início do tratamento, a inibição do crescimento tumoral através da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significante melhor do que as doses equivalentes de IgG1-CONA (teste de Mann Whitney, $p<0,05$).

[00431] A Figura 31C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão do tumor, com um corte ajustado em um volume de tumor >500 mm^3. A combinação IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G significantemente inibiu a progressão do crescimento tumoral se comparada ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo e se comparada a uma dose equivalente de IgG1-CONA (análise de Mantel-Cox no tamanho do corte de tumor de 500 mm^3: $p<0,05$).

[00432] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiu o crescimento tumoral em doses diferentes (0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg) e que a eficácia antitumoral foi significantemente melhor do que para as doses equivalentes de IgG1-CONA em um modelo de xenoenxerto *in vivo* de câncer gástrico humano da SNU-5.

Exemplo 33: Eficácia *in vivo* das doses diferentes da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer pulmonar da subcutâneos SK-MES-1

[00433] A eficácia antitumoral *in vivo* das doses diferentes da IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi avaliada e comparada a uma dosagem equivalente de IgG1-CONA no modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer pulmonar da subcutâneos SK-MES-1 na CrownBiosciences, Taicang, China. As células foram mantidas *in vitro* como uma cultura de monocamada em um meio suplementado em MEM com 10 % de soro bovino fetal e 0,01 mM de NEAA a 37º C em uma atmosfera de 5 % de CO_2 no ar. No dia 0, as células aderentes em uma fase de crescimento exponencial foram coletadas através do tratamento de tripsina-EDTA. 5 x 10^6 células foram injetadas em um volume de 100 µL de PBS no flanco de camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade (Shanghai Laboratory Animal Center). O manuseio dos camundongos e as medições do volume tumoral foram realizados como descrito no Exemplo 30. Vinte e um dias depois da inoculação tumoral, a média do tamanho do tumor atingiu 161 mm^3 e os camundongos foram designados em grupos usando o projeto de bloco aleatorizado e os tratamentos foram iniciados. Os camundongos foram tratados duas vezes de acordo com um regime de Q7D através da injeção i.v. de 200 µg (10 mg/kg), 40 µg (2 mg/kg) ou 10 µg (0,5 mg/kg) de anticorpo em 10 µL de PBS por g de peso corporal. Os camundongos no grupo de controle foram tratados em paralelo com 200 µg (10 mg/kg) de IgG1-b12. Depois da inoculação tumoral, o bem estar dos animais foi checado diariamente e os volumes de tumor foram medidos duas vezes por semana.

Tabela 9: Grupo de tratamentos e dosagem, Exemplo 33

# camun-dongos	Anticorpo	Anticorpo total por dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 µg)	200 µg (10 mg/kg)	21, 28

8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 µg)	40 µg (2 mg/kg)	21, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 µg) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	21, 28
8	IgG1-CONA (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	21, 28
8	IgG1-CONA (10 µg)	40 µg (2 mg/kg)	21, 28
8	IgG1-CONA (0,1 µg)	10 µg (0,5 mg/kg)	21, 28
8	IgG1-b12 (40 µg)	200 µg (10 mg/kg)	21, 28

[00434] A Figura 32A mostra os volumes de tumor médio por grupo de tratamento. Todas as doses da combinação de anticorpo IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G testadas inibiram o crescimento tumoral significantemente se comparadas ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo ($p<0,0001$), ao passo que IgG1-CONA teve somente um efeito significante se comparada ao IgG1-b12 a 10 mg/kg ($p<0,01$) e 2 mg/kg ($p<0,05$) mas não a 0,5 mg/kg (ANOVA de uma via seguido por um teste de comparações múltiplo de Dunnett). A Figura 32B mostra que no dia 14 depois do início do tratamento, a inibição do crescimento tumoral através da combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G foi significante melhor do que as doses equivalentes de IgG1-CONA a 2 mg/kg e 0,5 mg/kg (teste t não emparelhado, $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente).

[00435] A Figura 32C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão do tumor, com um corte ajustado em uma volume de tumor >1.000 mm^3. A combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G significantemente inibiu a progressão do crescimento tumoral se comparada ao anticorpo IgG1-b12 de controle negativo (análise de Mantel-Cox no tamanho de corte de tumor de 1.000 mm^3: $p\leq0,001$) e comparada a uma dose equivalente de IgG1-CONA a 2 mg/kg e 0,5 mg/kg (análise de Mantel-Cox no tamanho do corte de tumor de 1.000 mm^3: $p<0,05$).

[00436] Estes dados indicam que a combinação de IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G inibiu o crescimento tumoral em doses diferentes (0,5 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg) e que a eficácia

antitumoral foi significantemente melhor do que para as doses equivalentes de IgG1-CONA a 0,5 mg/kg e 2 mg/kg em um modelo de xenoenxerto *in vivo* de câncer pulmonar humano da SK-MES-1.

Exemplo 34: Níveis de expressão de DR5 nas diferentes linhagens de célula cancerosa humana

[00437] A densidade de DR5 por célula foi quantificada para as linhagens de célula cancerosa humana diferentes através da imunofluorescência indireta usando QIFIKIT com anticorpo monoclonal de camundongo B-K29 como descrito no Exemplo 2. As linhagens de célula foram categorizadas de acordo com a baixa expressão de DR5 (ABC < 10.000) e expressão de DR5 moderada (ABC > 10,000). As linhagens de célula de câncer humano SK-MEL-5 (ATCC, HTB-070) melanoma maligno, Jurkat (ATCC, TIB-152) leucemia da célula T aguda e Daudi (ATCC, CCL-231) linfoma de Burkitt foram verificadas ter uma baixa expressão de DR5 (faixa de QIFIKIT ABC de 3.500 a 6.500). As linhagens de célula SNU-C2B do carcinoma colorretal humano (ATCC, CCL-250), LS411N (ATCC, CRL-2159) e DLD-1 (ATCC, CCL-221) foram verificadas ter uma expressão de DR5 moderada (faixa de QIFIKIT ABC de 12.000 a 44.500).

Exemplo 35: Introdução de uma mutação realçadora da hexamerização não afeta a ligação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 às células de câncer de cólon humanas positivo para DR5.

[00438] A ligação às células de câncer de cólon humanas HCT 116 foi analisada pela citometria de fluxo quanto as variantes de anticorpo purificado de IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 com e sem a mutação de E430G. As suspensões de célula única foram preparadas e a ligação foi analisada quanto a série de preparação de anticorpo de diluição serial (faixa de 0,0006 a concentrações finais de 10 μg/mL em diluições de 4 vezes) como descrito no Exemplo 3. Depois da incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas duas vezes, recolocadas em suspensão em 100 μL de tampão

FACS e o ligação de anticorpo foi analisado em um analisador de célula BD LRSFFortessa (BD Biosciences). As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de não regressão não linear (resposta de dose sigmoidal com inclinações variáveis) usando o suporte lógico GraphPad Prism.

[00439] A Figura 33 mostra que os anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G mostraram a ligação das células similares a HCT 116 dependentes ao como seus anticorpos correspondentes sem a mutação de E430G. A introdução da mutação de E430G não teve nenhum efeito na ligação dos anticorpos de DR5. Os valores de EC50 foram calculados a partir de seis experimentos repetidos como 74,4 (+/- 58,4) ng/mL para IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e 101,2 (+/- 52,6) ng/mL para IgG1-hDR5-05-E430G.

Exemplo 36: Ligação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G como anticorpos únicos e como uma combinação ao às células cancerosas humanas positivas para DR5.

[00440] O anticorpo de ligação às células cancerosas humanas HCT 116 com expressão de DR5 moderada foi analisado pela citometria de fluxo para as amostras purificadas de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G rotulado com Alexa 647 e IgG1-hDR5-05-E430G rotulado com Alexa 647, ambos como agentes simples e como uma combinação dos dois anticorpos. 1 mg/mL de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G foram rotulados durante 1 hora na temperatura ambiente com um excesso molar de 5 de ácido carboxílico Alexa Fluor® 647, éster de succinimidila (Molecular Probes; Cat # A-20006) em 0,1 M de $NaHCO_3$ tampão de conjugação para atingir um grau de rotulação de três. O Alexa 647 em excesso livre foi removido em uma Coluna PD 10 (Amersham Bioscience, Cat # 17-0851-01). As suspensões de célula única foram preparadas e a ligação foi analisada quanto a série de preparação de anticorpo de diluição serial (faixa de concentrações finais de 0,0019 a 30 μg/mL em diluições de 5 vezes) como descrito no Exemplo 3.

Depois da incubação do anticorpo, as células foram lavadas duas vezes, recolocadas em suspensão em tampão FACS de 100 µL e a ligação de anticorpo foi analisada e, um analisador de célula BD LRSFFortessa (BD Biosciences). As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de regressão não linear (resposta de dose sigmoidal não linear com inclinações variáveis) usando o suporte lógico GraphPad Prism.

[00441] A Figura 34 mostra que tanto os anticorpos simples e a combinação do anticorpo que não bloqueia o IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G cruzados mostrou a ligação dependente de dose nas células cancerosas humanas HCT 116.

Exemplo 37: Ligação dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G ao DR5 de macaco cinomolgo.

[00442] A ligação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G purificados para as células de CHO expressando a isoforma curta de DR5 humano ou DR5 de macaco cinomolgo foi analisada pela citometria de fluxo. O construto otimizado nos códons para a expressão da proteína humana DR5 de isoforma curta com domínio da perda da função da morte de K386N (SEQ ID NO: 47 com base no número da Uniprot O14763-2) e proteína DR5 de macaco cinomolgo com a exclusão dos aminoácidos de 185 a 213 e o domínio da mutação da perda da função da morte de K420N (SEQ ID NO: 50; com base no número de acesso NCBI XP_005562887,1) foram gerados como descrito no Exemplo 1. A ligação às células de CHO transfectadas de DR5 foi analisada, geralmente como descrito no Exemplo 5. As células transfectadas foram armazenadas em nitrogênio líquido e rapidamente descongeladas a 37º C e colocadas em suspensão em um meio de 10 mL. As células foram lavadas com PBS e recolocadas em suspensão em tampão de FACS em uma concentração de $1,0x10^6$ células/mL. 100 µL das amostras de suspensão de célula (100.000 células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços e pelotizadas por centrifugação a 300xg durante 3 minutos a 4º C. 25

μL da série de preparação de anticorpo de diluição serial (concentrações finais de 0 a 20 μg/mL em diluições de 6 vezes) foram adicionados e incubados durante 30 minutos a 4º C. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com 50 μL de anticorpo secundário de IgG $F(ab')_2$ de cabra anti-humano conjugado a R-PE (Jackson ImmunoResearch; Cat nº 109-116-098; 1/100) durante 30 minutos a 4º C protegido da luz. As células foram lavadas duas vezes com 150 μL de tampão FACS, recolocadas em suspensão em 50 μL de tampão FACS e o anticorpo ligação foi analisado em um analisador de célula BD LRSFFortessa (BD Biosciences) registrando-se 10.000 eventos. As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de regressão não linear (resposta de dose sigmoidal com inclinações variáveis) usando o suporte lógico GraphPad Prism.

[00443] A Figura 35 mostra que os anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G apresentou a ligação dependente de dose ao DR5 humano e cinomolgo expressado nas células CHO. Tanto para IgG1-hDR5-01-G56T-E430G quanto IgG1-hDR5-05-E430G, os valores EC_{50} quanto à ligação ao DR5 humano e DR5 cinomolgo foram na mesma faixa com base nos quatro experimentos repetidos (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de EC50 para a ligação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G à DR5 humana e de cinomolgo. Com base nos quatro experimentos.

	CHO transfectado com DR5 humana		CHO transfectado com DR5 de cinomolgo	
	EC_{50} (μg/mL)	SD	EC_{50} (μg/mL)	SD
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G	0,13	0,034	0,27	0,175
IgG1-hDR5-05-E430G	0,12	0,027	0,17	0,084

Exemplo 38: Introdução da mutação de E430G melhora a eficácia da indução da morte celular através da combinação de anticorpo que não bloqueia os IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 cruzados.

[00444] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar o efeito da mutação realçadora de hexamerização E430G em IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 na capacidade dos anticorpos de exterminar as células de

câncer de cólon humanas COLO 205. Os anticorpos com e sem a mutação de E430G foram testadas como agente único e como combinações dos dois anticorpos que não bloqueiam em cruzado. As células COLO 205 foram coletadas como descrito no Exemplo 8. 100 μL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeados em placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e deixados aderir durante a noite a 37º C. Subsequentemente, 50 μL das séries de concentração da amostras de anticorpo (faixa de concentração final de 0,3 a 20,000 ng/mL nas diluições de 4 vezes) foram adicionados e incubados durante 3 dias a 37º C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 μM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat nº S6942). A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8.

[00445] A Figura 36 mostra que a combinação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi mais potente do que o anticorpo sozinho e mais potente do que a combinação dos anticorpos sem a mutação de E430G. Estes dados mostram que a introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G resultou na indução realçada do extermínio de células na ligação da combinação do anticorpo que não bloqueia em cruzado o IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G às células de câncer de cólon COLO 205 aderentes. Em contraste com a configuração experimental onde os anticorpos foram diretamente adicionados quando as células foram semeadas (Exemplo 8), os anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G simples não mostraram eficácia mas células COLO 205 neste experimento onde as células foram primeiro deixadas aderir à placa de fundo redondo de 96 poços antes de adicionar as amostras.

Exemplo 39: Introdução da mutação realçadora de hexamerização S440Y melhora a eficácia dos anticorpos anti-DR5 para induzir a morte celular e, células humanas do câncer de cólon.

[00446] O efeito da mutação realçadora de hexamerização S440Y na capacidade dos anticorpos únicos e a combinação de IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 para exterminar as células de câncer de cólon humanas COLO 205 foi estudado em um ensaio de viabilidade. As células foram coletadas e um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo foi realizado como descrito no Exemplo 8. Em resumo, suspensões de 100 μL de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços e ao mesmo tempo, 50 μL da série de preparação de anticorpo de diluição serial (faixa de concentrações finais de 0,0003 a 20 μg/mL em diluições de 4 vezes) foram adicionadas e incubadas durante 3 dias a 37º C.

[00447] A Figura 37A mostra que na configuração experimental onde os anticorpos foram diretamente adicionados quando as células foram semeadas, a introdução da mutação realçadora de hexamerização S440Y resultou no extermínio dependente de dose através dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-S440Y e IgG1-hDR5-05-S440Y simples, ao passo que os anticorpos tipo selvagem precursores IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 não foram capazes de exterminar as células de câncer de cólon COLO 205. Além disso, a eficácia da combinação de IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 foi melhorada através da introdução da mutação de S440Y em ambos os anticorpos, representados pela diminuição de EC50 (Figura 37B).

Exemplo 40: Introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G melhora a eficácia da indução da morte celular através da combinação de anticorpos anti-DR5 IgG1-DR5-CONA + IgG1-DR5-chTRA8.

[00448] Um ELISA de bloqueio cruzado para os anticorpos IgG1-DR5-CONA-K409R e IgG1-DR5-chTRA8-F405L foi realizado como descrito no Exemplo 7. As mutações K409R e F405L não são aqui relevantes e foram previamente mostradas que não tiveram nenhum efeito sobre a potência dos anticorpos com uma mutação E430G (Exemplo 22). A Figura

38A mostra a competição de ligação expressada como inibição em porcentagem de DR5ECD-FcHisCtag da ligação ao revestido anticorpo na presença do anticorpo competidor, com relação à ligação DR5ECD-FcHisCtag na ausência do anticorpo competidor (inibição em % = 100 – [(ligação na presença de anticorpo competidor/ligação na ausência de anticorpo competidor)]*100). A ligação de DR5ECD-FcHisCtag ao IgG1-DR5-CONA-K409R revestido não foi inibida na presença de IgG1-DR5-chTRA8-F405L solúvel. Vice-versa, a ligação de DR5ECD-FcHistag ao IgG1-DR5-chTRA8-F405L revestido também não foi inibida na presença de IgG1-DR5-CONA-K409R solúvel. Estes dados indicam que o IgG1-DR5-CONA-K409R e o IgG1-DR5-chTRA8-F405L não competem uns com os outros pela ligação do DR5ECD-FcHisCtag. Em seguida, o efeito da mutação realçadora de hexamerização E430G na capacidade da combinação do anticorpo que não bloqueia em cruzados anti-DR5 IgG1-DR5-CONA-C49W + IgG1-DR5-chTRA-8 para exterminar as células de câncer pancreático BxPC-3 humanas fixadas foi estudado em um ensaio de viabilidade como descrito no Exemplo 11. A Figura 38B mostra que a combinação de anticorpo IgG1-DR5-CONA-C49W-E430G + IgG1-DR5-chTRA8-E430G com mutações realçadoras de hexamerização mostrou um extermínio dependente da dose aumentado das células BxPC-3 se comparada à combinação dos anticorpos parentais sem a mutação realçadora de hexamerização E430G.

Exemplo 41: Capacidade da combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio de célula alvo em diferentes linhagens de célula de câncer.

[00449] A eficácia da combinação do anticorpo que não bloqueia IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G cruzados para induzir o extermínio foi analisada nas linhagens de célula cancerosa humana diferentes e comparadas à combinação parental de anticorpo sem a mutação de E430G e TRAIL. Um ensaio de viabilidade em câncer do cólon HCT-15,

HCT 116, HT-29 e SW480, câncer pancreático BxPC-3, HPAF-II e PANC-1, câncer gástrico SNU-5, câncer pulmonar A549 e SK-MES-1 e câncer de células da pele A375 foi realizado, essencialmente como descrito no Exemplo 11. Em resumo, 100 μL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeados em placas de 96 poços e incubados a 37º C durante a noite. 50 μL da amostra de anticorpo (133 nM de concentração final) ou TRAIL/APO-2L recombinante humano (eBioscience, Cat nº BMS356; concentração final de 133 nM) foram adicionados e incubados durante 3 dias a 37º C. Tanto TRAIL quanto a combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G mostra o extermínio das linhagens da célula alvo do câncer humano originando de diferentes indicações (Figura 39). O extermínio da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi significante se comparado ao anticorpo IgG1-b12 de controle em 6 das 11 linhagens de célula testadas. Para estas linhagens de célula correspondentes, a porcentagem das células viáveis foi significantemente menor depois da incubação com a combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G do que depois da incubação com a combinação de anticorpo sem a mutação de E430G. Não houve correlação entre a eficácia do extermínio de IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G e os níveis de expressão de DR5 alvo (descrito no Exemplo 2).

Exemplo 42: Triagem de um painel de linhagem celular do câncer humano para a eficácia citotóxica da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G.

[00450] A atividade da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi testada e comparada à atividade de TRAIL em um painel de 235 linhagens de célula representando 14 linhagens tumorais: câncer renal, do tecido neural, colorretal, gástrico, de mama (predominantemente câncer de mama triplo-negativo (TNBC)), câncer

pulmonar de célula não pequena (NSCLC), de bexiga, pancreático, ovariano, melanoma, hepático, endometrial, de cabeça e pescoço e câncer pulmonar de célula pequena (SCLC). Um ensaio de 72 horas ATPlite (exceto para as linhagens de célula DLD-1 e HCT116, para as quais um ensaio de 120 hora foi realizado) com análise de inibição de crescimento foi realizado em duas partes na Horizon Discovery Ltd, UK. As amostras foram testadas como quatro réplicas em placas de ensaio de 384 poços. A série de diluição serial do anticorpo, começando de uma concentração final de 0,072 μM foi usada para todas as linhagens de célula testadas. Para TRAIL (Invitrogen; Cat # PHC1634) a série de diluição serial começando da concentração final de 0,01 μM para as linhagens de célula testadas na primeira parte e concentração final de 0,17 μM para as linhagens de célula testadas na segunda parte da triagem foi usada. A inibição em porcentagem foi calculada usando as fórmulas: Se $T \geq V(0)$ do que a inibição em porcentagem = $100*[1-(T-V(0))/(V-V(0))]$; Se $T<V(0)$ do que a inibição em porcentagem = 100 %, com T = luminescência da amostra de teste, V(0) = luminescência da amostra de controle do meio no dia 0 e V = luminescência da amostra de controle do meio no dia 3. As linhagens de célula responsivas e não responsivas foram agrupadas por um valor limiar de resposta máxima categorizando as linhagens de célula mostrando a inibição de ≥ 70 % como responsivas e linhagens de célula mostrando ≤ 69 % de inibição como não responsivas (Figura 40; Tabela 11). As linhagens de célula responsivas tanto para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e monoterapia TRAIL foram encontradas para todas as indicações de tumor testadas, exceto o câncer pulmonar de célula pequena (SCLC). Tabela 11: Resultados para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e monoterapia **TRAIL** como determinado em um ensaio de viabilidade de 3 dias, triagem na Horizon Discovery Ltd, UK, para um painel de linhagens de célula representando diferentes indicações do câncer humano:renal (A), tecido

neural (B), colorretal (C), gástrico (D), câncer de mama triplo-negativo (TNBC) (E), câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC) (F), bexiga (G), pancreático (H), ovariano (I), melanoma (J), hepático (K), endometrial (L), cabeça e pescoço (M) e câncer de célula pulmonar pequena (SCLC) (N). Os valores de IC50 e a porcentagem de inibição máxima são tabelados.

Tabela 11A: Resultados da Triagem da linhagem celular do câncer renal para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em um ensaio de viabilidade de triagem de 3 dias

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição máxima (%)	IC50 (nM)	Inibição máxima (%)
A704	1	0,475	99,7	3,443	77,1
A498	2	1,223	98,9	0,079	96,1
G-401	2	0,509	94,1	0,068	76,6
CAL-54	1	1,533	91,7	0,268	71,6
ACHN	2	0,843	89,9	0,356	32,4
CAKI-2	1	1,565	87,3		5,7
769-P	2	0,957	57,7	1,941	39,4
G-402	2	0,605	50,4	0,173	15,0
786-0	2	0,005	7,7	287,593	2,6

Tabela 11B: Resultados da triagem da linhagem da célula do tecido neural para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em um ensaio de viabilidade de 3 dias

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Max (%)	IC50 (nM)	Inibição Max (%)
A172	2	0,888	100,0	0,029	98,2
SF295	2	0,764	99,2	0,023	87,5
SF126	2	0,713	98,9	0,013	85,6
H4	2	0,459	98,8	0,007	98,9
YH-13	2	1,248	94,4	0,317	39,5
U-87 MG	2	1,784	87,8	0,053	8,0
DBTRG-05MG	2	0,971	46,8	0,087	36,0
KNS-81	2	13,008	30,6	0,013	-6,6
SNB-75	2	3,225	14,2	105,178	9,6
NMC-G1	2	0,005	13,8	17,591	15,2

Tabela 11 continuação

Tabela 11C: Resultados da Triagem da Linhagem Celular do Câncer Colorretal para o Anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

Linhagem celular	Triagem#	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
CL-11	1	0,620	100,0	1,318	85,9
GP2D	1	0,738	100,0	0,003	100,0
HT-115	1	2,101	100,0	0,107	99,7
SNU-1197	1	1,076	100,0	0,053	100,0
COLO-205	1	0,360	99,9	2,269	83,5
COLO-206F	1	0,200	99,9	0,146	99,2
CL-34	1	0,380	99,8	0,024	98,8
HRT-186	1	0,433	99,3	9,240	52,5
HCT-15	1	0,813	98,8	0,129	98,6
SNU-407	1	0,836	98,5	0,098	96,1
MDST8	1	1,035	93,6	1,190	58,3
COLO-201	1	0,568	93,6	0,168	89,1
HT55	1	1,025	91,0	0,110	76,4
SNU-175	1	1,813	90,1	0,122	96,2
HCT-116_ARID1A (Q456*/Q456*)	1	0,235	86,2	10,502	50,2
DLD-1	1	0,938	83,1	3,954	55,1
SNU283	1	5,628	81,9		40,3
CL-40	1	1,555	79,9	1,975	57,3
HCT-116_KRAS (+/-)	1	0,855	77,7	0,253	88,7
SW837	1	1,399	76,6	0,940	83,8
LOVO	1	4,512	75,7		44,5
LS-411N	1	3,549	73,1		26,9
HT-29	1	2,966	65,5		12,2
SNU1033	1	4,446	60,9	10,057	51,7
SW480	1	1,093	60,2	2,037	55,2
COLO-678	1	3,670	58,6		10,1
DLD-1_BRCA2 (-/-)	1	1,826	58,3	0,516	60,0
HCT-116_PIK3A (+/-)KO mt H1047R	1	0,756	57,8	1,251	59,8
C2BBe1	1		49,5		8,8
SNU-C2B	1		43,0	0,713	71,3
SW1116	1		42,4		23,1
HCT-116_PAR-007	1		29,0		14,2
HCT-116_TP53 (-/-)	1		19,6		17,2
SW1417	1		19,1		12,2
RKO	1		14,5		10,5
HCT-116_PTEN (-/-)	1		11,9		38,0
COLO320DM	1		10,1		8,0
COLO-320	1		9,9		3,9

Tabela 11 continuação

Tabela 11D: Resultados da Triagem da Linhagem Celular do Câncer Gástrico para o Anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem do ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

Linhagem celular	Triagem#	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC50 (nM)	Inibição Max (%)	IC50 (nM)	Inibição Max (%)
SNU-620	1	0,809	100,0	0,045	99,9
SNU-668	1	0,370	99,9	0,041	99,6
SNU-719	1	1,483	98,9	1,132	85,4
SNU-601	1	0,520	98,6	0,284	85,2

NUGC-3	1	0,671	96,7		38,7
GSU	1	0,169	96,4	0,454	81,6
SNU5	1	0,729	95,9	0,109	91,2
SNU-216	1	5,484	84,0		49,6
NCC-StC-K140	1	1,059	77,8		9,8
KE-97	1	1,175	57,2		23,4
LMSU	1	3,563	56,6		9,0
RERF-GC-1B	1		45,1		14,0
MKN1	1		36,8		10,5
SH-10-TC	1		31,6		34,9
ECC12	1		22,7		27,4
GSS	1		11,8		15,4
ECC10	1		8,3		14,0

Tabela 11E: Resultados da Triagem da Linhagem Celular do Câncer de Mama para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
SUM159PT*	2	0,569	99,2	0,033	98,6
DU-4475*	2	1,102	94,5	0,079	87,0
HCC1806*	2	2,678	92,5	0,050	97,8
BT-549*	2	1,021	83,3	0,285	44,0
BT-20*	2	2,843	82,8	0,089	48,9
HCC1187*	2	1,521	82,8	0,066	99,4
MDA-MB-436*	2	0,762	77,7	0,053	76,3
HCC38*	2	0,903	70,6	0,080	96,9
HCC70*	2	18,703	69,3	346,839	3,6
HMC-1-8*	2	0,714	67,7	0,232	70,0
MDA-MB-231*	1	1,409	60,2	0,110	53,3
SK-BR-3	2	1,757	40,4	0,518	38,1
MDA-MB-468*	2	3,772	33,3	0,647	89,4
HCC1937*	2	8,548	28,0	0,647	28,5
T47D	2	2,557	17,1	346,732	8,4
MDA-MB-453*	2	0,723	13,0	34,643	20,7
MCF7	2	19,492	10,2	0,055	21,7

*TNBC

Tabela 11 continuação

Tabela 11F: Resultados da Triagem da Linhagem Celular do Câncer Pulmonar de Célula não Pequena (NSCLC) para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
DV-90	1	0,215	100,0	1,189	96,1
NCI-H820	1	0,857	99,7	0,023	100,0

LCLC-97TM1	1	1,202	96,6		4,6
COR-L23-CPR	1	0,707	96,0	5,482	58,4
LOU-NH91	1	0,529	94,8	5,382	63,0
LCLC-103H	1	0,548	92,2	8,018	54,2
T3M-10	1	1,058	90,1	0,495	83,7
LU-99	1	1,879	81,9		6,3
HOP-62	1	0,899	81,7		55,6
EPLC-272H	1	1,233	79,7		51,7
LUDLU-1	1	2,196	77,9	0,475	91,1
RERF-LC-KJ	1	2,771	71,4	0,633	68,9
LXF-289	1	3,582	62,7		12,7
COR-L105	1	2,990	57,5		35,7
LC-1sq	1	7,710	56,6	0,781	70,1
NCI-H460	1	15,034	53,3	0,853	86,1
LC1F	1		50,3	0,451	74,3
SW1573	1		46,1		13,9
LU-65	1		38,9		32,4
HLC-1	1		36,8		32,6
VMRC-LCD	1		21,6		19,2
LK-2	1		19,0		5,6
Calu-1	1		13,0		22,0
CAL-12T	1		10,4		11,9
COLO-699	1		7,7		2,8
BEN	1		7,5		8,1

Tabela 11G: Resultados da triagem da linhagem celular do câncer de bexiga para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
5637	2	0,828	99,3	0,060	99,1
SW780	1	0,421	98,5	0,016	97,9
RT-112	2	3,520	96,1	0,325	50,9
RT4	2	4,638	95,5	0,244	91,5
UM-UC-3	1	0,906	94,4	0,005	99,4
TCCSUP	2	1,367	69,6	0,048	51,5
T-24	2	1,300	63,0	0,166	20,5
HT-1197	2	0,782	40,9	0,167	31,8
SCaBER	1	3,768	29,6	0,082	25,8
J82	1	68,272	15,9	33,567	11,5
HT-1376	2	67,114	15,3	159,873	10,6

Tabela 11 continuação

Tabela 11H: Resultados da triagem da linhagem celular do câncer pancreático para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G	TRAIL

Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
HuP-T3	1	0,728	91,8	0,223	88,4
PSN1	1	0,655	91,6	0,205	86,9
Panc 02,13	1	2,288	85,9	1,905	60,5
BxPC-3	1	0,448	83,9		46,5
KP-4	1	1,853	80,0		23,6
CFPAC-1	1	13,635	57,2		13,2
HPAF-II	1	9,896	56,9		13,3
KP-2	1	10,251	54,2		3,9
KLM-1	1		41,0		12,7
KP-3	1		37,3		23,5
CAPAN-2	1		20,6		4,8
PK-1	1		6,4	0,548	88,3

Tabela 11I: Resultados da triagem da linhagem celular do câncer de ovário para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
SNU119	1	0,681	99,3	0,082	83,7
59M	1	0,846	98,6	0,049	98,5
JHOM-2B	1	8,294	82,0		21,7
COV434	1	1,093	80,4	0,395	73,1
OVCAR-5	1	2,731	79,0	1,120	70,6
OVK18	1	0,865	73,2	0,230	80,0
JHOM-1	1	1,835	68,8	0,596	58,1
COV644	1	3,375	68,2	0,271	74,9
MCAS	1	13,877	57,2	56,779	48,4
JHOS-4	1	73,734	49,6		12,5
OV7	1		48,3		20,4
COV504	1		19,0		11,7
OVTOKO	1		18,9		28,0
OVISE	1		13,5		4,0
KURAMOCHI	1		10,1		13,4
JHOC-5	1		8,5		18,4

Tabela 11 continuação

Tabela 11J: Resultados da triagem da linhagem celular de Melanoma para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
COLO-679	1	0,524	99,5		24,9
COLO-783	1	0,503	98,2	0,224	80,9
COLO-800	1	0,365	95,7		33,5
Hs 294T	1	0,595	94,1	0,019	91,1

RVH-421	1	0,577	91,3		22,5
MEL-HO	1	0,760	89,2		16,7
WM-266-4	1	1,257	80,3		42,5
COLO858	1	0,567	68,1		12,6
MEL-JUSO	1	1,349	67,6		7,6
COLO-818	1	1,061	64,8		7,8
IGR-39	1	0,813	63,9		20,1
IGR-1	1	1,066	60,1		23,3
IGR-37	1	9,359	54,7		18,0
COLO-849	1		51,9		17,6
A375	1		51,2		47,1
Hs 936.T	1		41,0		20,7
SK-MEL-30	1		12,5		6,1
IPC-298	1		11,2		5,7
HMCB	1		7,0		1,0

Tabela 11K: Resultados da triagem da linhagem celular do câncer hepático para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
SNU-878	1	0,709	99,5		36,2
SNU-308	1	1,521	98,8	0,937	72,4
HuH-28	1	0,903	96,7		17,5
SNU-478	1	2,097	82,2	0,516	83,3
HLE	1	0,315	81,9	8,360	56,0
SNU-869	1	1,842	68,8	2,951	58,6
Li-7	1	1,614	65,9		20,4
HuCCT1	1	8,034	55,6		7,5
SNU-1196	1		44,8		44,3
HUH-6-clone5	1		42,3		20,2
SNU-1079	1		40,3		24,9
HuH-1	1		30,7		47,7
RH-41	1		10,1		3,0
SNU-761	1		9,1		7,1

Tabela 11 continuação

Tabela 11L: Resultados da triagem da linhagem celular do câncer endometrial para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
HEC-265	1	0,399	100,0	0,021	100,0
MES-SA	1	0,510	100,0	0,107	92,6
JHUEM-2	1	0,613	89,6	0,165	66,4
RL95-2	1	1,649	88,0	0,155	97,7
SNG-II	1	1,049	79,3	1,028	77,2
JHUEM-3	1		46,2		18,4
TEN	1		43,2	1,205	70,0

HEC-1-A	1	39,6		22,8
HEC-108	1	32,8	1,479	64,9
MFE-296	1	22,7		8,7
COLO-684	1	14,3		16,6
SK-UT-1	1	13,4		10,9
HEC-1	1	13,2		8,1
MFE-280	1	11,4		11,0
HEC-50B	1	5,5		16,6

Tabela 11 continuação

Tabela 11M: Resultados da triagem da linhagem celular de câncer da cabeça e pescoço para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
YD-15	1	1,369	100,0	0,114	100,0
TE-4	1	0,879	99,9	0,107	81,0
KYM-1	1	0,438	99,4		30,2
FTC-238	1	0,426	93,8	3,922	86,7
KYSE-70	1	1,346	79,2		46,0
TE-10	1	3,602	68,0		24,4
TE-6	1	7,502	61,9	3,923	55,3
TE-9	1	1,139	60,3	0,300	73,6
TE-1	1	3,051	58,3		23,0
BICR 31	1	4,670	52,6		38,9
KYSE-410	1		51,0		10,6
CJM	1		48,8		12,8
BICR 22	1		42,0		13,6
KYSE-30	1		38,0		8,0
SCC-15	1		34,8		19,4
TE-8	1		33,4		39,6
PE-CA-PJ34-cl C12	1		28,9		4,7
EC-GI-10	1		25,0		29,6
TE-5	1		23,0		11,6
HSC-4	1		12,8		0,5
YD-8	1		10,8		3,4
KYSE-270	1		7,1		5,4
BICR 18	1		-0,1		3,4

Tabela 11N: Resultados da triagem da linhagem celular de câncer pulmonar de célula pequena (SCLC) para o anticorpo (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) e terapia de TRAIL como determinado em uma triagem de ensaio de viabilidade de 3 dias na Horizon, UK.

		IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
Linhagem celular	Triagem#	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)	IC50 (nM)	Inibição Máx (%)
LU-134-A	1		47,7		28,0
IST-SL2	1		24,4		21,0
NCI-H69	1		23,2		14,5
NCI-H345	1		19,2		16,4

LU-139	1	18,7	10,0
SHP-77	1	9,2	9,1
NCI-H446	1	7,3	11,7
LU-135	1	6,0	9,7

Exemplo 43: Capacidade de combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio da célula cancerosa em diferentes razões de combinação.

[00451] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a capacidade da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio das células de câncer pancreático BxPC-3 e células de câncer de cólon HCT-15, quando combinadas em razões diferentes de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G. As razões de anticorpo de 1: 0, 9: 1, 3: 1, 1: 1, 1: 3, 1: 9 e 0: 1 em uma série de diluição serial (variando as concentrações finais de 0,006 a 20 μg/mL em diluições de 5 vezes) foram testadas em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 16.

[00452] Em concentrações totais de anticorpo de 20 μg/mL, 4 μg/mL e 0,8 μg/mL, o extermínio de células BxPC-3 (Figura 41A) e HCT-15 (Figura 41B) foi igualmente eficaz em todas as razões de anticorpo contendo ambos os anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G. Ao contrário, os anticorpos únicos (razões 1: 0 e 0: 1) não incluem o extermínio. A 0,16 μg/mL, as concentrações de anticorpo total, as combinações testadas de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G induziram o extermínio, embora em um grau menor do que as concentrações mais altas de anticorpo e a eficácia é afetada usando-se razões diferentes.

Exemplo 44: A combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G induz a morte celular programada dependente de caspase.

[00453] Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a citotoxicidade da combinação de variantes de anticorpo de IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 com e sem a mutação realçadora de hexamerização

E430G na presença e ausência de um inibidor de caspase. Um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo com série de diluição serial de anticorpo ou amostras de TRAIL (concentrações finais da faixa de 0,002 a 133 nM em diluições de 4 vezes) foi realizado como descrito no Exemplo 18.

[00454] O extermínio das células BxPC-3 foi inibido na presença do inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK para TRAIL e as combinações de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 e IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (Figura 42). Estes dados indicam que, como TRAIL, as combinações de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 e IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G induziram a morte celular programada dependente de caspase.

Exemplo 45: Ativação de Caspase-3 e -7 na ligação da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G nas células cancerosas humanas.

[00455] A ativação da Caspase-3/7 foi medida em tempo usando o ensaio de Caspase-Glo 3/7, essencialmente como descrito no Exemplo 20. Em resumo, as células foram coletadas através da tripsinização, passadas através de uma peneira celular, pelotizadas através da centrifugação durante 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em um meio de cultura em uma concentração de $1,6x10^5$ células/ml. 25 µL das suspensões de célula única (4.000 células por poço) foram semeadas em placas de cultura de 384 poços (Perkin Elmer, Cat nº 6007680) e incubadas durante a noite a 37º C. 25 µL da amostra foi adicionada (26,6 nM concentrações finais) e incubadas durante 1, 2, 4 e 6 horas a 37º C. As placas foram removidas da incubadora para deixar a temperatura de diminuição até a temperatura ambiente. As células foram pelotizadas através da centrifugação por três minutos a 300 g. 25 µL de sobrenadante foram removidos e recolocados por 25 µL de Substrato de Caspase-Glo 3/7. Depois de misturar por agitação por um minuto a 500 rpm, as placas foram incubadas por uma hora na temperatura ambiente.

A luminescência foi medida em uma Leitora de Multirrótulos EnVision (PerkinElmer).

[00456] No último decorrer de 1, 2, 4 a 6 horas, tanto o TRAIL quanto a combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G induziram mais a ativação de caspase-3/7 mais rápida e mais potente nas células de BxPC-3 se comparado à combinação de anticorpo WT de IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 sem a mutação realçadora de hexamerização (Figura 43).

Exemplo 46: A potência *in vitro* da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G não requer a presença de um reticulador de Fc secundário.

[00457] Um ensaio de viabilidade foi realizado para comparar a capacidade da combinação de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G para induzir o extermínio de células de câncer de cólon HCT-15 humanas e células de câncer pancreático BxPC-3 humanas na ausência e presença de um anticorpo secundário reticulador. IgG1-DR5-CONA, que é conhecido apresentar um extermínio realçado na presença de um anticorpo secundário reticulador, foi testado no mesmo ensaio para comparação. Um ensaio de viabilidade na ausência e presença de reticulador secundário foi realizado, essencialmente como descrito no Exemplo 21. Em resumo, 100 μL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas durante a noite a 37º C. 50 μL de amostra de anticorpo (concentração final de 4 μg/mL) na ausência ou presença de fragmentos de $F(ab')_2$ de um anticorpo IgG de cabra anti-humano e incubados durante 3 dias a 37º C. Como um controle positivo para o extermínio das células, as células foram incubadas com 5 μM de estaurosporina. A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8.

[00458] A combinação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G induziu o extermínio potente nas células BxPC-3 e HCT15 e a citotoxicidade não foi novamente realçada na presença de um reticulador secundário (Figura 44). Ao contrário, a eficácia de IgG1-DR5-CONA e a combinação de anticorpos do tipo selvagem IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 foi realçada através da presença de um reticulador secundário tanto em BxPC-3 quanto na HCT15. Estes dados indicam que o extermínio das células cancerosas BxPC-3 e HCT15 através da combinação dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G é independente da presença de um reticulador de Fc secundário.

Exemplo 47: Ativação de complemento na ligação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G às células de CHO transitoriamente transfectadas com DR5 humana ou de cinomolgo.

[00459] Para analisar a capacidade dos anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G de ativar complemento, um ensaio da citotoxicidade *in vitro* dependente de complemento (CDC) e a deposição do componente de complemento C3c foram medidos nas células de CHO que foram transitoriamente transfectadas com a isoforma curta da DR5 humana ou de macaco. Os construtos da DR5 ancoraram a mutação de K386N (humana) ou K420N (macaco cinomolgo) no seu domínio da morte para prevenir o extermínio através da indução da apoptose na ligação dos anticorpos agonísticos. As transfecções transitórias das células de CHO com DR5 humana ou de macaco (*Macaca fascicularis*) foram realizadas como descrito no Exemplo 1.

[00460] Para o ensaio de CDC, as 0,1 x 10^6 células foram pré-incubadas em placas de poliestireno com fundo redondo de 96 poços (Greiner bio-A Cat # 650101) com séries de concentração de anticorpos purificados em um volume total de 80 µL durante 15 min em um agitador na RT. Em seguida, 20 µL de soro humano normal (NHS; Cat # M0008 Sanquin,

Amsterdan, Países Baixos) foram adicionados como uma fonte de complemento e incubadas em uma incubadora a 37° C por 45 min (20 % de concentração de NHS final; 0,003 a 10,0 μg/mL de concentrações finais de anticorpo em diluições de 3 vezes). A reação foi interrompida colocando-se as placas em gelo antes de pelotizar as células através da centrifugação e substituir o sobrenadante em 30 μL de 2 μg/mL de solução de iodeto de propídio (PI; Sigma Aldrich, Zwijnaarde, Países Baixos). A porcentagem de células positivas PI foi determinada por citometria de fluxo e, um dispositivo de triagem Intellicyt iQue® (Westburg). Os dados foram analisados usando os valores de melhor ajuste de um ajuste de resposta de dose não linear usando as concentrações transformadas em log em um GraphPad PRISM 5.

[00461] Para a análise da deposição de C3b, 0,1 x 10^6 células foram pré-incubadas em placas de 96 poços de fundo redondo com uma série de concentração dos anticorpos purificados (concentrações finais de anticorpo de 0,003 a 10,0 μg/mL de em diluições de 3 vezes) em um volume total de 80 μL durante 15 min em um agitador na RT. Em seguida, 20 μL de soro exauridos em C5 (Quidel; Cat # A501) foram adicionados como uma fonte de complemento e incubadas em uma incubadora a 37° C por 45 min (concentração final de NHS de 20 %). As células foram pelotizadas e subsequentemente incubadas com 50 μL de complemento de C3c policlonal de coelho-anti-humano rotulado com FITC (Dako; Cat # F0201; 2 μg/mL) em tampão FACS durante 30 minutos a 4º C. As células foram lavadas duas vezes com tampão FACS e recolocadas em suspensão em 30 μL de tampão FACS. A deposição de C3b nas células foi determinada através da citometria de fluxo em um dispositivo de triagem Intellicyt iQue® (Westburg). Os dados foram analisados usando os valores de melhor ajuste de um ajuste de resposta de dose não linear usando as concentrações transformadas em log-no GraphPad PRISM 5.

[00462] Tanto o extermínio dependente de complemento (Figura 45A-

B) quanto a deposição de C3b (Figura 45C-D) nas células de CHO transfectadas com DR5 foram observadas para IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G com curvas de resposta de dose tanto para os anticorpos únicos quanto para a combinação. Estes dados indicam que a capacidade intrínseca dos anticorpos IgG1 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G para induzir ativação de complemento na ligação alvo na superfície da célula foi preservada tanto para os anticorpos únicos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G quanto para a combinação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G.

Exemplo 48: Análise da triagem da combinação de fármaco para realce da eficácia da combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G com um painel de compostos sobre as linhagens de célula de câncer de cólon humano.

[00463] De modo a identificar compostos clinicamente relevantes que demonstram efeitos inibidores sinergísticos em combinação com a combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, 100 compostos representando classes terapêuticas diferentes foram triados quanto à sinergia potencial nas linhagens de célula de câncer de cólon. Um ensaio ATPlite de 72 horas (para LS-411N, SNU-C2B e SW480) ou 120 horas (para DLD-1 e HCT 116) com análise da inibição do crescimento foi realizado em uma matriz de combinação otimizada 6x6 em placas de ensaio de 384 poços na Horizon Discovery Ltd, UK. Todas as amostras foram testadas em quatro réplicas. A inibição do crescimento percentual foi calculada usando as fórmulas: Se $T \geq V(0)$ então a inibição do crescimento percentual = $100*[1-(T-V(0))/(V-V(0))]$; Se $T<V(0)$ então a inibição do crescimento percentual = $100*[1-(T-V(0))/V(0)]$, com T = luminescência da amostra de teste, V(0) = luminescência da amostra de controle do meio no dia 0 e V = luminescência da amostra de controle do meio no dia 3. De modo a identificar efeitos sinergísticos, a atividade autocruzada média foi

determinada para cada classe terapêutica usando compostos representativos. Para medir os efeitos da combinação em excesso de aditividade de Loewe, a Horizon Discovery Ltd planejou uma medida escalar para caracterizar a força da interação sinergística denominada a Contagem de Sinergia. A equação da Contagem de Sinergia integra o volume de atividade experimentalmente observada em cada ponto na matriz em excesso de uma superfície modelo numericamente derivada da atividade dos agentes componentes usando o modelo de Loewe para aditividade. Os temos adicionais na equação da Contagem de Sinergia são usados para normalizar quanto a vários fatores de diluição usados para agentes individuais e para permitir a comparação de contagens de sinergia através de um experimento inteiro. A inclusão da supressão de inibição positiva ou um multiplicador Idata remove ruído quase ao nível de efeito zero e resultados de tendências para interações sinergísticas que ocorrem em níveis de atividade altos. A Contagem de Sinergia (S) foi calculada usando a fórmula: $S = \log f_X \log f_Y \Sigma \max(0,Idata)(Idata - ILoewe)$ com $f_{x,y}$ = fatores de diluição usados para cada agente único. Contagens de Sinergia maiores do que o autocruzamento médio mais 3σ foram consideradas sinergias candidatas nos níveis de confiança de 99%.

[00464] A Tabela 12 mostra as Contagens de Sinergia para todos os 100 compostos testados. A sinergia com a combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi observada para uma ou mais linhagens de célula com compostos das classes terapêuticas diferentes, incluindo produtos quimioterapêuticos (incluindo reguladores citoesqueletais e agentes que danificam o DNA/RNA), inibidores da cinase, inibidores do caminho de PI3K, inibidores de RAS, agentes moduladores de apoptose, inibidores de proteassoma, moduladores epigenéticos (incluindo inibidores HDAC) e outros. A Figura 46 mostra cinco exemplos do efeito da inibição do crescimento de compostos testados em combinação com a combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G. Birinapant

(Figura 46C), oxaliplatina (Figura 46A), irinotecano (Figura 46B) e paclitaxel (Figura 46E) são exemplos que realçaram o efeito de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, enquanto baricitinib (Figura 46D) é um exemplo que não mostrou nenhum efeito sobre a atividade de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G.

Tabela 12			Contagens de Sinergia em cinza > autocruzamento médio + 3σ				
Classe terapêutica	Composto	Alvo	DLD-1	HCT-116	LS-411N	SNU-C2B	SW480
Regulador citoesqueletal	vinblastina	TUBB2	17,7	14,6	36	12,6	16,8
Regulador citoesqueletal	docetaxel	TUBB1	17,6	7,9	36,2	15,8	19,5
Regulador citoesqueletal	paclitaxel	TUBB1	11,4	11,8	40,8	15,6	14,7
Regulador citoesqueletal	vincristina	TUBB2	17,3	13,9	33	17,2	12,1
Regulador citoesqueletal	vinorrelbina	TUBB2	5,9	8,1	21,5	11	7,7
Agentes que danificam DNA/RNA	Gencitabina	Antimetabólito	20,3	12,2	5,7	18,5	31,1
Agentes que danificam DNA/RNA	Citarabina	Antimetabólito	20,8	10,7	11,4	24,6	19,6
Agentes que danificam DNA/RNA	Daunorrubicina	Intercalador de DNA	13,8	5,5	10,4	17,5	16,7
Agentes que danificam DNA/RNA	Cisplatina	Agente alquilador de DNA	8,8	6,7	15,4	12,9	18,9
Agentes que danificam DNA/RNA	Carboplatina	Agente alquilador de DNA	11,3	5,8	12	11,6	19,5
Agentes que danificam DNA/RNA	Oxaliplatina	Agente alquilador de DNA	2,8	3,1	10	13,1	5,8
Agentes que danificam DNA/RNA	Clorambucila	Agente alquilador de DNA	4,6	1	3,8	11,4	7,9
Agentes que danificam DNA/RNA	Melfalan	Agente alquilador de DNA	6	1,1	3,4	9	7,6
Agentes que danificam DNA/RNA	Metotrexato	Antimetabólito	0,1	0,5	6,6	1,7	2,5
Agentes que danificam DNA/RNA	Dacarbazina	Agente alquilador de DNA	0,8	1,5	0,3	2	2,5
Agentes que danificam DNA/RNA	Fludarabina	Antimetabólito	0,5	0,9	0,1	3,1	0,3
Agentes que danificam DNA/RNA	Fluorouracila	Antimetabólito	1,2	1	1,1	0,4	0,8
Agentes que danificam DNA/RNA	Bendamustina	Agente alquilador de DNA	0,1	0	0,3	3	0,6
Agentes que danificam DNA/RNA	Temozolomida	Agente alquilador de DNA	0,1	0	0,1	0,6	0,8
Agentes que danificam DNA/RNA	Ifosfamida	Agente alquilador de DNA	0,1	0	0,2	0,3	0,1
Moduladores Epigenéticos	Belinostat	HDAC	8,6	4,1	4,5	16,4	10,2
Moduladores Epigenéticos	(+)-JQ1	Bromodomínio BET	8,2	2,6	13,4	10,7	5,8
Moduladores Epigenéticos	Decitabina	DNA Metiltransferase	1,1	2,8	0	4,8	3,4
Inibidores do Caminho PI3K	TIC10	Akt, ERK	15,5	2,2	23,3	13,1	3,4
Inibidores do Caminho PI3K	GDC-0941	PI3K	4,9	2	12,4	7,1	12,9
Inibidores do Caminho PI3K	AZD 8055	mTOR	3	1,7	10	12,2	3,9
Inibidores do Caminho PI3K	PIK-93	PI4K, PI3K	1	1,2	5,2	5,1	4,1
Inibidores do Caminho PI3K	BEZ235	mTOR, PI3K	2,4	1,4	1,1	5,4	3,2
Inibidores do Caminho PI3K	Tensirolimus	mTOR	0,7	0,6	0,6	4,5	1,6
Inibidores do Caminho PI3K	Everolimus	mTOR	0,4	0,4	0,3	3,2	1,6
Inibidores do Caminho PI3K	GSK1059615	mTOR, PI3K	0,4	0,6	0,4	0,8	1,7
Inibidores do Caminho PI3K	IPI-145	PI3K	0	0	0,2	1	0,1
Inibidores do Caminho PI3K	IC-87114	PI3K	0	0,1	0,2	0,1	0

Tabela 12			Contagens de Sinergia em cinza > autocruzamento médio + 3σ					
Classe terapêutica	Composto	Alvo	DLD-1	HCT-116	LS-411N	SNU-C2B	SW480
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Crizotinib	c-Met, Alk	13,4	7,7	16,1	5,4	8,9
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	RAF265	Inibidor de RAF/VEGFR	5,6	2,5	10,5	13,7	4,5
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Dasatinib	Família Abl e Src de Cinases	11,4	1,9	7,8	1	10,2
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	BMS-754807	IGFR, InsR, c-Met, TrkB	11,3	2,1	10,8	1,3	5,9
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Sunitinib	VEGFR, PDGFR	9,2	0,7	7,2	1,4	5,2
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	XL184	VEGFR, c-Met, Ret, c-Kit, Flt, Tie, AXL	4,1	1	5,8	1,5	6
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Lapatinib	EGFR, HER2	1	0,4	7,3	2,6	6,4
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	AP24534	Família Abl e Src de Cinases	4,3	1,4	2,6	1,8	3,7
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	GSK1904529A	IGF-1R	1,4	0,2	6	2,7	2,2
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Erlotinib	EGFR	4,3	0,2	1,9	1,2	1
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Gefitinib	EGFR	4,9	0,2	1	1,1	1,3
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	OSI-906	IGFR, InsR	0,5	0,1	1,7	1	3,5
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Masitinib	c-Kit, PDGFR	0,6	0,3	1,4	1,7	1,9
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	BGJ398	FGFR	1	0,1	1,4	0,8	1,6
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	MGCD-265	c-Met, VEGFR	0,2	0,1	0,7	3,1	0,5
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	AST-1306	EGFR, HER2, HER4	0,3	0,1	1,8	0,7	0,9
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Nilotinib	Família Abl e Src de Cinases	0,1	0	0,2	1,7	0,4

Tabela 12			Contagens de Sinergia em cinza > autocruzamento médio + 3σ				
Classe terapêutica	Composto	Alvo	DLD-1	HCT-116	LS-411N	SNU-C2B	SW480
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	PCI-32765	BTK	0,5	0	0,3	0,6	0,4
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	Imatinib	Família Abl e Src de Cinases	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	INCB28060	c-Met	0,2	0,1	0	0,4	0
Inibidores da Tirosina Cinase Receptora	JNJ-38877605	c-Met	0,1	0	0,1	0,1	0
Reguladores de Apoptose	Birinapant	XIAP, cIAP	5,8	16,4	61,2	37	54,5
Reguladores de Apoptose	TW-37	Família Bcl	13,8	5,4	29,9	11,1	10,5
Reguladores de Apoptose	Obatoclax	Família Bcl	6,1	1,6	22,8	4,7	11,8
Reguladores de Apoptose	YM155	Survivina	5,2	0,5	9	11,5	12,1
Reguladores de Apoptose	PAC 1	Caspase	10,6	4,2	2,9	6	3,9
Reguladores de Apoptose	ABT-263	Família Bcl	3,4	0	7,6	1	8
Reguladores de Apoptose	ABT-737	Família Bcl	1,5	0	4,2	1,1	7,5
Reguladores de Apoptose	SB 415286	GSK3	0,4	0,8	2,1	0,7	3,8
Reguladores de Apoptose	SB-216763	GSK3	0,5	0,1	1,1	0,3	1,4
Reguladores de Apoptose	Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF	TRAIL	0	0	0,1	0,2	0,9
Reguladores de Apoptose	ABT-199	Família Bcl	0	0	0,1	0	0
Inibidores de Topoisomerase	Topotecano	Top1	20,3	5	29	21,2	30,5
Inibidores de Topoisomerase	Teniposida	Top2	18,8	6,2	29,3	19,8	25,1
Inibidores de Topoisomerase	10-Hidroxicamptotecina	Top1	21,9	9,6	16,9	12,4	30,1
Inibidores de Topoisomerase	Doxorrubicina	Top2	16,2	4,6	9,4	18	20,5
Inibidores de Topoisomerase	Irinotecano	Top1	15	4,4	6,8	13,4	24,7
Inibidores de Topoisomerase	Etoposida	Top2	17	2	11,1	14,2	19,4
Inibidores de Topoisomerase	Epirrubicina	Top2	15,6	4,9	5,8	15,1	17,7
	Tipifarnib	FTase	3,1	3,3	24,3	7,2	5
	Idasanutlina	MDM2	6,3	3,2	16,3	10,4	6,1
	Ácido Hidroxâmico de Suberoilanilida		4,4	2,5	4,4	11	7,3
	Bortezomib	Proteassoma	3	2,6	7,2	7,5	8,9
	GSK429286A		4,9	2,6	9,8	5,3	5,3

Tabela 12			Contagens de Sinergia em cinza > autocruzamento médio + 3σ				
Classe terapêutica	Composto	Alvo	DLD-1	HCT-116	LS-411N	SNU-C2B	SW480
	GF 109203X		4,3	3	5,3	1,6	6,2
	AZD6244		1,5	2,7	0,7	0,6	11,7
	Trametinib		4,1	4	0,9	0,6	7,2
	Sorafenib		2,6	0,5	6	2,9	3,9
	Enzastaurina		0,9	0,6	5,6	0,5	6,3
	Citrato de Tamoxifeno		0,3	0,3	8	0,7	2,9
	Go 6976		2,9	0,9	1,9	1,7	3,1
	Olaparib		0,7	1,8	2,7	2,5	1
	SP 600125		3,3	0,6	0,5	2	0,9
	Dabrafenib		2,2	0,7	0,5	0,5	3,1
	GDC-0879		0,1	0,2	0,4	0,7	1,6
	PLX-4032		0,6	0,1	0,6	0,5	1
	Baricitinib	Inibidores de JAK	0,1	0,1	1,1	0,6	0,1
	JNK-IN-8	Inibidor de JNK	0,2	0	0,1	1,1	0,4
	Dexametasona		0,1	0	0,4	0,8	0
	ABT-888		0,2	0,2	0,7	0,1	0
	Salirasib		0,1	0,1	0	0,4	0,4
	CP-690550	Inibidores de JAK	0,1	0	0,6	0,1	0
	GDC-0449		0,1	0	0,2	0,3	0,1
	Metilprednisolona		0	0	0	0,6	0
	Pomalidomida		0,1	0	0	0,5	0
	Prednisona		0,1	0	0,1	0,2	0
	Lenalidomida		0	0	0,1	0,2	0

Tabela 12: Contagens de Sinergia durante 100 compostos de classes terapêuticas diferentes que foram testados em combinação com IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G nos ensaios de viabilidade nas linhagens de célula de câncer de cólon LS-411N, SNU-C2B, SW480, DLD-1 e HCT 116. Os efeitos sinergísticos (Contagens de Sinergia > autocruzamento médio + 3σ) são indicados em cinza.

Exemplo 49: Eficácia *in vivo* dos anticorpos anti-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G em um modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer de cólon COLO 205.

[00465] A eficácia antitumor *in vivo* de anticorpos IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G foi avaliada para os anticorpos isolados e a combinação de ambos anticorpos e comparada com os anticorpos precursores sem a mutação E430G no modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer de cólon humano COLO 205. A inoculação da célula de tumor, manuseio dos camundongos, medidas do crescimento do tumor e determinação do ponto final foram realizados, essencialmente como descrito no Exemplo 26. 3 x 10^6 células foram injetadas em um volume de 100 µL de PBS no flanco de camundongos SCID fêmeas de 5 a 8 semanas de idade (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). No dia 9, o volume médio do tumor foi medido e os camundongos foram separados em grupos com variação igual do tamanho do tumor. Os camundongos foram tratados pela injeção intravenosa (i.v.) de 10 µg (0,5 mg/kg) de anticorpo em 200 µL de PBS no dia 9. Os camundongos no grupo de controle foram tratados com 10 µg (0,5 mg/kg) de IgG1-b12.

Tabela 13: Grupos de tratamento e dosagem

# camun-dongos	# analisados	Anticorpo	Total anticorpo dose	Dia de dosagem depois da inoculação de tumor
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G	0,5 mg/kg	9
8	8	IgG1-hDR5-05-E430G	0,5 mg/kg	9
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G IgG1-hDR5-05-E430G	0,5 mg/kg	9
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T	0,5 mg/kg	9
8	8	IgG1-hDR5-05	0,5 mg/kg	9
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T IgG1-hDR5-05	0,5 mg/kg	9
8	8	IgG1-b12	0,5 mg/kg	9

[00466] A Figura 47A mostra volumes médios de tumor por grupo de tratamento com o tempo. A introdução da mutação E430G nos anticorpos isolados IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G resultou na inibição realçada do crescimento do tumor comparado aos anticorpos precursores sem a mutação E430G. O tratamento com as combinações de

anticorpo induziu a regressão completa do tumor, tanto para IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G quanto para a combinação de anticorpos precursores sem a mutação E430G. No dia 19 o tamanho médio do tumor em todos os grupos tratados com anticorpos DR5 foi significantemente menor do que nos animais tratados com o anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (teste de Mann Whitney ($P < 0,001$))(dados não mostrados). A Figura 47B mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão do tumor, com um conjunto de corte em um volume de tumor >500 mm^3. Comparado aos camundongos tratados com anticorpo de controle negativo IgG1-b12, o crescimento do tumor foi significantemente retardado em todos os grupos tratados com anticorpos anti-DR5 (análise de Mantel-Cox no corte de tamanho do tumor de 500 mm^3: $p< 0,0001$). Camundongos tratados com os anticorpos isolados IgG1-hDR5-01-G56T e IgG1-hDR5-05 sem a mutação realçadora de hexamerização E430G mostrou crescimento do tumor significantemente prematuro comparada aos camundongos tratados com os outros anticorpos anti-DR5 testados ((análise de Mantel-Cox n corte de o tamanho do tumor de 500 mm^3: $p< 0,0001$).

Exemplo 50: Efeito de uma mutação realçadora da hexamerização sobre a eficácia *in vivo* da combinação de anticorpos anti-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 em um modelo de xenoenxerto subcutâneos de câncer de cólon HCT15.

[00467] A eficácia antitumor *in vivo* da combinação de anticorpo anti-DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi comparada com aquela de IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 sem a mutação realçadora de hexamerização E430G no modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer de cólon humano HCT15 na CrownBiosciences, Taicang, China. As células foram mantidas *in vitro* como uma cultura de monocamada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO2 no ar. As células aderentes em uma fase de

crescimento exponencial foram coletadas pelo tratamento com tripsina-EDTA. 5 x 10^6 células foram injetadas em um volume de 100 µL de PBS no flanco de camundongos BALB/c nus fêmeas de 7 a 9 semanas de idade. O cuidado e uso de animais durante o estudo foram conduzidos de acordo com as regulamentações da Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Os volumes de tumor foram medidos duas vezes por semana em duas dimensões usando um calibrador e o volume foi expresso em mm^3 usando a fórmula: $V = 0,5\ a\ x\ b^2$ onde a e b são os diâmetros longo e curto do tumor, respectivamente. Os camundongos foram designados em grupos usando o planejamento de bloco randomizado e os tratamentos foram iniciados quando o tamanho médio do tumor atingiu 161 mm^3 (8 camundongos por grupo). Os camundongos foram tratados três vezes de acordo com um regime Q7D pela injeção i.v. de 0,5 mg/kg de anticorpo (0,25 mg/kg de cada anticorpo na combinação). Os camundongos no grupo de controle foram tratados em paralelo com 0,5 mg/kg de IgG1-b12.

[00468] A Figura 48A mostra volumes médios de tumor por grupo de tratamento. A combinação de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G mostrou melhor inibição do crescimento do tumor do que IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05. No dia 21 o tamanho médio do tumor em camundongos tratados com a combinação IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi significantemente menor do que em camundongos tratados com uma dose equivalente de IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 (teste de Mann Whitney: $P < 0,0011$) (Figura 48B). A Figura 48C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier de progressão de tumor, com um conjunto de corte em um volume de tumor >750 mm^3. O crescimento do tumor em camundongos tratados com a combinação IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi significantemente tardio do que em camundongos tratados com uma dose equivalente de IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05.

[00469] Estes dados indicam que a introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G na combinação de anticorpo anti-DR5 IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G resultou em inibição realçada do crescimento de tumor em um modelo de xenoenxerto *in vivo* com células de câncer de cólon humano HCT15.

Exemplo 51: Eficácia *in vivo* de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G em combinação com paclitaxel em um modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer pulmonar humano SK-MES-1.

[00470] A eficácia antitumor *in vivo* de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G foi avaliada em combinação com paclitaxel no modelo de xenoenxerto subcutâneo de câncer pulmonar humano SK-MES-1 na CrownBiosciences, Taicang, China. O cultivo de célula, inoculação da célula de tumor, manuseio dos camundongos, medições do crescimento do tumor e determinação do ponto final foram realizados como descrito no Exemplo 33. 21 dias depois da inoculação do tumor, o tamanho médio do tumor atingiu 167 mm^3 e os camundongos foram designados em grupos usando o planejamento de bloco randomizado e os tratamentos foram iniciados. Os camundongos foram tratados duas vezes de acordo com um regime Q7D pelas injeções i.v. de 2 mg/kg de anticorpo e 15 mg/kg de paclitaxel ambos dosados em 10 μL de PBS por g de peso corporal como indicado na Tabela 14.

Tabela 14: Grupos de tratamento e dosagem, Exemplo 53

# camundongos	Composto	Total por dose	Dia de dosagem depois da randomização
8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G IgG1-hDR5-05-E430G	2 mg/kg	0, 7
8	Paclitaxel	15 mg/kg	0, 7
8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G IgG1-hDR5-05-E430G Paclitaxel	2 mg/kg anticorpo + 15 mg/kg paclitaxel	0, 7
8	IgG1-b12	2 mg/kg	0, 7

[00471] A Figura 49A mostra volumes médios de tumor por grupo de tratamento. O tratamento apenas com anticorpo (2 mg/kg IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) ou tratamento com 2 mg/kg de

anticorpo em combinação com 15 mg/kg de paclitaxel ou apenas 15 mg/kg de paclitaxel todos demonstraram eficácia antitumor comparada com IgG1-b12. A Figura 49B mostra o volume de tumor por grupo de tratamento no dia 16. Em todos os grupos de tratamento, a carga de tumor foi significantemente mais baixa comparada com IgG1-b12 (teste de Mann-Whitney, $p<0,01$). A Figura 49C mostra uma plotagem de Kaplan-Meier da progressão de tumor, com um conjunto de corte em um volume de tumor > 500 mm^3. A combinação de 15 mg/kg de paclitaxel com 2 mg/kg de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G significantemente prolongou a sobrevivência livre de progressão comparada com apenas paclitaxel ou anticorpo (teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, corte do tamanho do tumor de 500 mm^3: $p<0,05$).

Exemplo 52: Análise farmacocinética (PK) de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G

[00472] A taxa de depuração de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e IgG1-hDR5-05-E430G foi estudada em um experimento de PK em camundongos SCID para os compostos isolados e para a combinação dos dois anticorpos em comparação com os anticorpos precursores sem a mutação E430G.

[00473] Camundongos SCID fêmeas de 7 a 10 semanas de idade (C.B-17/IcrHan@Hsd-Prkdc<scid, Harlan) (3 camundongos por grupo) foram intravenosamente injetados com 20 μg de anticorpo (1 mg/kg) em um volume de injeção de 200 μL. Amostras de sangue de 50 a 100 μL foram coletadas da veia safena em 10 minutos, 4 horas, 1 dia, 2 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias depois da administração do anticorpo. O sangue foi coletado dentro de frascos contendo heparina e centrifugados durante 5 minutos a 10.000 g. As amostras de plasma foram diluídas 1:20 para os quatro primeiros pontos de tempo (15 μL de amostra em 285 μL de PBSA (PBS suplementado com 0,2% de albumina sérica bovina (BSA)) e 1:10 para os dois últimos pontos de tempo (30 μL de amostra em 270 μL PBSA) e armazenadas a -20°C até a

determinação das concentrações de anticorpo.

[00474] As concentrações de IgG humana totais foram determinadas usando um ELISA de sanduiche. O mAb de camundongo anti-humano IgG-capa clone MH16 (CLB Sanquin, Cat # #M1268) foi usado como anticorpo de captura e revestido em 100 µL durante a noite a 4°C nos 96 poços das placas de ELISA Microlon (Greiner, Alemanha) em uma concentração de 2 µg/mL em PBS. As placas foram bloqueadas pela incubação em um agitador de placa durante 1 h na RT com PBSA. Depois de lavar, 100 µL de amostras de plasma diluídas em série (faixa de 0,037 a 1 µg/mL em diluições de 3 vezes) foram adicionados e incubados sobre um agitador de placa durante 1 h na RT. As placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST (PBS suplementado com 0,05% de Tween 20) e subsequentemente incubados sobre um agitador de placa durante 1 h na RT com 100 µL de imunoglobulina IgG de cabra anti-humano rotulada com peroxidase (#109-035-098, Jackson, West Grace, PA; 1:10.000 em PBST suplementado com 0,2% de BSA). As placas foram novamente lavadas três vezes com 300 µL de PBST antes da incubação durante 15 minutos na RT com 100 µL de substrato do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolino-6-sulfônico) [ABTS; Roche, Cat # 11112 422001; 1 tablete em 50 mL de tampão ABTS (Roche, Cat # 11112 597001)] protegido da luz. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido oxálico a 2% e incubação durante 10 minutos na RT. A absorbância foi medida em uma leitora de microplaca (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm. A concentração foi calculada usando-se o material injetado como uma curva de referência. Como um controle de placa, IgG1 humana purificada (O sítio de ligação, Cat # BP078) foi incluída. As concentrações de IgG humana (em µg/mL) foram plotadas (Figura 50A) e a Área Sob a Curva (AUC) foi calculada usando Graphpad prism 6.0. A depuração até o último dia de amostragem de sangue (dia 21) foi determinada pela fórmula D*1.000/AUC, em que D é a dose de injeção (1 mg/kg) (Figura 50B).

[00475] Nenhuma diferença na taxa de depuração de plasma foi observada entre IgG1-hDR5-01-G56T-E430G ou IgG1-hDR5-05-E430G e seus anticorpos precursores sem a mutação E430G, ambos quando injetados como agentes isolados ou como as combinações destes (Figura 50).

Exemplo 53: O anticorpo anti-DR5 IgG1-DR5-CONA com uma mutação realçadora da hexamerização E430G é capaz de matar as células de câncer de cólon humano.

[00476] O presente estudo ilustra a capacidade do anticorpo anti-DR5 IgG1-DR5-CONA com a mutação realçadora de hexamerização E430G para matar células de câncer de cólon humano COLO 205 fixadas. As células COLO 205 foram coletadas como descrito no Exemplo 8. 100 μL das suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços de fundo chato e incubadas durante a noite a 37°C. 50 μL das amostras da série de concentração de anticorpo (faixa de 0,04 a 10 μg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes) foram adicionados e incubados durante 3 dias a 37°C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 μM de estaurosporina. A viabilidade das culturas celulares foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 8. A luminescência foi medida em uma Leitora de Multirrótulo EnVision (PerkinElmer). Os dados foram analisados e plotados usando a regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = [(amostra de anticorpo com luminescência - amostra de estaurosporina com luminescência)/(amostra de anticorpo sem luminescência - amostra de estaurosporina com luminescência)]*100.

[00477] A Figura 51 mostra que a introdução da mutação realçadora de hexamerização E430G resultou em matança dependente da dose pelo IgG1-DR5-CONA-E430G, ao passo que o anticorpo tipo selvagem precursor IgG1-

DR5-CONA não foi capaz de matar as células de câncer de cólon COLO 205 fixadas.

Exemplo 54: Desenvolvimento de Formulação de Anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G

Abreviações usadas:

Abreviação/Termo	Definição
A_{280}	Absorbância a 280 nm
API	Ingrediente Farmacêutico Ativo
CE	Eletroforese Capilar
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DoE	Planejamento de Experimentos
HC	Cadeia pesada
HMW	Peso Molecular Alto
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
icIEF	Focalização Isoelétrica Capilar Imageada
LC	Cadeia Leve
LMW	Peso Molecular Baixo
NaCl	Cloreto de Sódio
PS-80	Polissorbato 80
RH	Umidade Relativa
% Pd	Polidispersividade Percentual
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEC	Cromatografia por Exclusão de Tamanho
$T_{inicial}$	Início da Temperatura de Fusão
UV	Ultravioleta

Material:

[00478] Anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G formulado a 20 mg/ml, a menos que de outro modo estabelecido.

Métodos

Calorimeria de Varredura Diferencial (DSC)

[00479] A temperatura de fusão das amostras de proteína foi determinada usando o equipamento de DSC MicroCal Capillary.

Aparência

[00480] A aparência foi determinada pela avaliação visual.

pH

[00481] O pH foi medido usando um medidor de pH Mettler Toledo SevenMulti.

Conteúdo de Proteína pelo UV A280

[00482] O conteúdo de proteína foi determinado pela espectroscopia

UV/Vis usando um Espectrofotômetro UV/Vis da Agilent (Modelo 8453)

Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

[00483] A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada em um sistema de HPLC Agilent 100, usando uma coluna TOSOH, TSK-gel G-3000SWxL (7,8 × 300 mm) (Sigma).

Focalização Isoelétrica Capilar com Imageamento (icIEF)

[00484] A focalização isoelétrica capilar com imageamento foi realizada usando um Analisador iCE 3 equipado com Autoamostrador PrinCE.

Eletroforese Capilar –Dodecil Sulfato de Sódio (CE-SDS)

[00485] A eletroforese capilar reduzida e não reduzida foi realizada usando um Sistema de Eletroforese Capilar Beckman Coulter Série PA800Plus. Beta Mercaptoetanol foi usado para amostras reduzidas.

Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

[00486] A dispersão de luz dinâmica foi realizada usando uma Leitora de Placa Wyatt DynaPro.

Resultados

1. Triagem Biofísica de Linha de Base

[00487] A triagem biofísica inicial foi realizada para selecionar combinações de tampão/pH para mover para frente na triagem excipiente. A Tabela 15 exibe os dados obtidos da triagem de tampão inicial, em que os tampões de glutamato, acetato, succinato, histidina, citrato e fosfato foram testados. DSC e DLS foram usadas para avaliar a estabilidade térmica. A análise de DSC proveu as temperaturas de fusão (T_m1 e T_m2) junto com o $T_{inicial}$. A análise de DLS proveu informação sobre polidispersividade e raio hidrodinâmico da proteína.

[00488] Com base nos dados de DSC, glutamato pH 5,0, acetato pH 5,5 e succinato pH 6,0 tiveram valores mais altos de $T_{inicial}$ quando comparados com as suas contrapartes em pH mais baixo. Os valores mais

altos de $T_{inicial}$ são indicativos de melhor estabilidade térmica da proteína. Todas as formulações com histidina no pH 5,5, 6,0 e 6,5 exibiram valores de $T_{inicial}$ comparativamente altos com estes valores aumentando levemente com o aumento do pH. O $T_{inicial}$ para tampão de citrato no pH 6,0 e 7,0 foi 54°C ao passo que o $T_{inicial}$ do fosfato no pH 7,5 foi 54°C, respectivamente. Os resultados dos dados de DLS da triagem biofísica inicial não se correlacionou fortemente com os resultados de formulação obtidos da DSC. Especificamente, graus altos de polidispersividade foram observados nas formulações com pH mais alto que exibiram melhor estabilidade térmica como observada na DSC. Por exemplo, histidina, pH 5,5 teve um %Pd de 6,3, comparada com pH 6,0 e 6,5 que exibiu um %Pd de 10,8 e 15,6, respectivamente (Tabela 15). As formulações com fosfato e citrato tiveram %Pd mais alto comparadas com o resto das formulações. Com base nos dados obtidos de DSC e DLS, as formulações com glutamato pH 5,0, acetato pH 5,5, histidina pH 5,5 e succinato pH 6,0 foram adicionalmente triadas na presença de vários excipientes. As formulações com fosfato e citrato não foram selecionadas devido à alta % de polidispersividade e a possibilidade potencial de desestabilização da proteína nestes tampões.

Tabela 15. Temperaturas de fusão de Triagem de Linha de Base Inicial com DSC (Topo), DLS (Fundo)

DSC

Formulação	Tampão	pH	Início (°C)	T_m1 (°C)	T_m2 (°C)
A	25 mM de Glutamato	4,5	46	53,33	77,14
B		5,0	51	58,37	79,28
C	25 mM de Acetato	4,5	46	53,90	77,18
D		5,5	52	60,08	79,39
E	25 mM de Succinato	5,5	53	N/A	79,86
F		6,0	56	60,90	79,69
G	25 mM de Histidina	5,5	51	56,65	77,56
H		6,0	53	58,90	79,02
I		6,5	55	59,17	79,32
J	25 mM de Citrato	6,0	54	60,01	78,32
K		7,0	54	60,85	79,33
L	25 mM de Fosfato	6,5	48	61,67	78,88
M		7,5	54	60,23	77,69

DLS

Formulação	Tampões	pH	%Pd	Raio (nm)
A	25 mM de Glutamato	4,5	3,3	3,498
B		5,0	8,1	4,191
C	25 mM de Acetato	4,5	7,1	3,119
D		5,5	14,9	4,615
E	25 mM de Succinato	5,5	9,9	5,491
F		6,0	12,9	6,082
G	25 mM de Histidina	5,5	6,3	4,376
H		6,0	10,8	4,347
I		6,5	15,6	3,421
J	25 mM de Citrato	6,0	20,1	8,131
K		7,0	16,9	7,778
L	25 mM de Fosfato	6,5	12,9	6,602
M		7,5	13,6	6,711

[00489] As formulações selecionadas acima foram triadas na presença de 150 mM de arginina, cloreto de sódio, sacarose e sorbitol. Os dados desta porção da triagem biofísica da linha de base são mostrados na Tabela 16. Glutamato pH 5,0 teve $T_{inicial}$ mais baixo na presença de excipientes mais provavelmente devido ao pH baixo, mesmo na presença de excipientes estabilizantes de sorbitol e sacarose. Com base nos dados mostrados na Tabela 16, foi observado que para as formulações com acetato, o $T_{inicial}$ aumentou na presença de sacarose. Um aumento no $T_{inicial}$ foi observado para as formulações com histidina na presença de sacarose e sorbitol. O $T_{inicial}$ aumentado foi apenas observado para a formulação de succinato contendo sacarose. Para as amostras com acetato, as formulações consistindo em NaCl e arginina tiveram valores de $T_{inicial}$ de 51°C e 52°C, respectivamente. As formulações com histidina contendo NaCl demonstraram um valor de início mais alto quando comparado com a formulação na presença de arginina. O valor $T_{inicial}$ para a formulação de histidina com arginina foi 47°C ao passo que o valor $T_{inicial}$ para a formulação com histidina na presença de NaCl foi 51°C. Os valores de $T_{inicial}$ para formulações com succinato contendo excipientes carregados foram equivalentes (54°C). Os valores iniciais foram no geral os mais altos para tampões de succinato contendo excipientes carregados comparados com os outros três tipos de tampão, enquanto que os tampões de histidina e succinato exibiram valores de início mais altos do que os tampões de glutamato e acetato na presença de sorbitol e sacarose.

Tabela 16. Temperaturas de Fusão de Tampão de Linha de Base com Excipientes DSC (Topo), DLS (Fundo)

DSC

Formulação	Excipiente	Tampão	Início (°C)	T_m1 (°C)	T_m2 (°C)
1A	150 mM de Arginina	25 mM de Glutamato pH 5,0	48	55,07	78,23
1B	150 mM de NaCl		49	54,82	78,70
1C	150 mM de Sorbitol		50	55,10	79,71
1D	150 mM de Sacarose		50	57,93	80,22
2A	150 mM de Arginina	25 mM de Acetato pH 5,5	51	58,30	79,84
2B	150 mM de NaCl		52	58,74	80,22
2C	150 mM de Sorbitol		52	60,68	80,93
2D	150 mM de Sacarose		54	60,72	81,00
3A	150 mM de Arginina	25 mM de Histidina pH 5,5	47	54,86	76,84
3B	150 mM de NaCl		51	n/um	79,84
3C	150 mM de Sorbitol		54	62,83	80,70
3D	150 mM de Sacarose		57	63,38	80,48
4A	150 mM de Arginina	25 mM de Succinato pH 6,0	54	60,41	80,35
4B	150 mM de NaCl		54	61,04	80,94
4C	150 mM de Sorbitol		53	62,48	81,14
4D	150 mM de Sacarose		56	62,39	81,49

DLS

Formulação	Tampão	pH	Excipiente	%Pd	Raio (nm)
1A	Glutamato	5,0	Arginina	9,7	5,661
1A		5,0		9,5	5,755
1B		5,0	NaCl	4,4	5,406
1B		5,0		5,9	5,409
1C		5,0	Sorbitol	14,7	4,112
1C		5,0		13,8	4,082
1D		5,0	Sacarose	23,7	5,904
1D		5,0		23,7	5,837
2A	Acetato	5,5	Arginina	5,4	5,689
2A		5,5		6,5	5,695
2B		5,5	NaCl	9,4	5,746
2B		5,5		8,8	5,625
2C		5,5	Sorbitol	Multimodal	9,367
2C		5,5		Multimodal	9,548
2D		5,5	Sacarose	Multimodal	6,549
2D		5,5		23,7	5,793
3A	Histidina	5,5	Arginina	9,4	5,741
3A		5,5		8,6	5,744
3B		5,5	NaCl	6,3	5,477
3B		5,5		7,2	5,501
3C		5,5	Sorbitol	Multimodal	43,32
3C		5,5		Multimodal	44,901
3D		5,5	Sacarose	Multimodal	7,459
3D		5,5		Multimodal	14,909
4A	Succinato	6,0	Arginina	20,7	6,818
4A		6,0		12,6	5,938
4B		6,0	NaCl	11,2	6,122
4B		6,0		11,5	6,112
4C		6,0	Sorbitol	13,9	6,786
4C		6,0		14,0	6,561
4D		6,0	Sacarose	23,7	8,262
4D		6,0		23,9	8,281

[00490] Com base nos resultados de DLS (Tabela 16), todas as formulações consistindo em sacarose e sorbitol demonstraram %Pd que foram multimodais e alto raio hidrodinâmico que é indicativo de formação de agregados macromoleculares. Os dados de DLS também demonstraram que estas formulações na presença de excipientes carregados com cloreto de sódio e arginina tiveram %Pd baixa.

[00491] No geral, os dados obtidos tanto de DSC quanto DLS sugeriram que 25 mM de acetato no pH 5,5 na presença de NaCl e arginina e formulações com Histidina no pH 5,5 na presença de cloreto de sódio foram melhores candidatos para desenvolvimento de formulação adicional.

2. Triagem de NaCl

[00492] O anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G foi formulado a 40 mg/mL em 30 mM de histidina, pH 5,5 na presença de quatro concentrações diferentes de NaCl (0, 25, 50 e 100 mM de NaCl) para determinar o efeito sobre a solubilidade e separação de fase. As amostras foram armazenadas a -5 ± 3°C durante 24 h em uma prateleira liofilizadora pré-resfriada. Depois de 24 horas, o conjunto de amostras foi testado pela aparência. Nenhuma separação de fase foi observada em nenhuma das amostras preparadas.

3. Triagem de Tensoativo

[00493] O anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G foi formulado em 30 mM de histidina, pH 5,5 na presença de 0, 0,03 ou 0,06% p/v de Tween-80 e estressado com três ciclos de congelamento-descongelamento. Amostras idênticas foram agitadas durante período de 48 horas. Depois de estressar a amostra, o conjunto de amostras foi testado pela aparência, A280, SEC, CE-SDS reduzida e CE-SDS não reduzida.

3.1 Aparência

[00494] Nenhuma diferença visual foi observada entre amostras em nenhuma das amostras no estudo de triagem de tensoativo. Todas as amostras foram de líquidos levemente amarelos, opalescentes e livres de particulados

visíveis.

3.2 Conteúdo de Proteína pelo UV A280

[00495] As concentrações de anticorpo obtidas pela análise UV não foram significantemente diferentes e variaram entre 18,54 e 20,73 mg/mL (dados não mostrados).

3.3 SEC

[00496] A pureza do monômero não diferiu significantemente e nenhum pico novo foi observado para qualquer uma das amostras de triagem de tensoativo. A pureza de todas as amostras foi entre 98,8 e 99,0% (dados não mostrados).

3.4 CE-SDS reduzida

[00497] A pureza (LC e HC %) não diferiu significantemente e nenhum pico novo foi observado para qualquer uma das amostras de triagem de tensoativo. A pureza de todas as amostras foi de 95,6 a 96,1% (dados não mostrados).

3.5 CE-SDS Não Reduzida

[00498] A pureza do pico principal não diferiu significantemente e nenhum pico novo foi observado para nenhuma das amostras de triagem de tensoativo. A pureza de todas as amostras foi entre 90,5% e 92,1% (dados não mostrados).

3.6 Conclusões de Triagem de Tensoativo

[00499] Nenhuma mudança na aparência, concentração de proteína ou pureza foi observada entre amostras não estressadas e estressadas contendo concentrações de 0, 0,03 e 0,06% de PS-80. Estes dados indicam que os tensoativos não realçam a estabilidade do anticorpo nestas formulações.

4. Triagem de Crioprotetor

[00500] Na triagem de crioprotetor, o anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G foi formulado em 30 mM de Histidina, pH 5,5 com três concentrações diferentes (0, 5 ou 10% p/v) de sacarose e estressado com três ciclos de

congelamento-descongelamento. Amostras idênticas foram agitadas durante um período de 48 horas. Depois de estressar a amostra, o conjunto de amostras foram testadas pela aparência, A280, SEC, CE-SDS reduzida e CE-SDS não reduzida.

4.1 Aparência

[00501] Nenhuma diferença visual foi observada entre as amostras contendo 0%, 5% ou 10% de sacarose estressadas com três ciclos de congelamento-descongelamento e agitadas por um período de 48 horas. Todas as amostras foram um líquido levemente amarelo, opalescente e livre de particulados visíveis.

4.2 Conteúdo de Proteína pela UV A280

[00502] As concentrações de anticorpo obtidas pela análise UV não foram significantemente diferentes. As concentrações variaram entre 19,06 e 24,86 mg/mL (dados não mostrados).

4.3 SEC

[00503] A pureza monomérica não diferiu significantemente e o crescimento de novos picos não foi observado para nenhuma das amostras de triagem de crioprotetor. A pureza de todas as amostras foi entre 98,9 e 99,1% (dados não mostrados).

4.4 CE-SDS Reduzida

[00504] A pureza (LC e HC %) não diferiram significantemente e o crescimento de novos picos não foi observado para nenhuma das amostras de triagem de crioprotetor. A pureza de todas as amostras foi entre 95,3 e 95,9% (dados não mostrados).

4.5 CE-SDS Não Reduzida

[00505] A pureza do pico principal não diferiu significantemente e nenhum crescimento de novos picos foi observado para nenhuma das amostras de triagem de criprotetor. A pureza de todas as amostras foi entre 91,5 e 92,0% (dados não mostrados).

4.6 Conclusões da Triagem de Crioprotetor

[00506] Nenhuma mudança na aparência, concentração de proteína ou pureza foi observada entre amostras não estressadas e estressadas contendo concentrações de 0%, 5% e 10% de sacarose. Estes dados indicaram que os crioprotetores não realçam a estabilidade do anticorpo nestas formulações.

5. Estudos de estabilidade DoE

[00507] O projeto de formulação para o Estudo DoE é mostrado na Tabela 17. As amostras foram armazenadas durante até 4 semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. As amostras iniciais foram testadas pelo pH, UV e DSC. Depois da armazenagem, o conjunto de amostras foram testadas pela Aparência, pH, A280, DLS, SEC, icIEF, CE-SDS (reduzida e não reduzida).

Tabela 17. Designações de Formulação para o Estudo DoE do Anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G

Abreviação da Formulação	Tampão	pH	NaCl	Arginina	Sorbitol	Sacarose
F1	30 mM de Acetato	5,0	0	0	0	0
F2	30 mM de Acetato	5,0	150	0	0	0
F3	30 mM de Acetato	5,0	0	150	0	0
F4	30 mM de Acetato	5,0	100	50	0	0
*F5	30 mM de Acetato	5,5	0	0	0	0
F6	30 mM de Acetato	5,5	150	0	0	0
F7	30 mM de Acetato	5,5	0	150	0	0
F8	30 mM de Acetato	5,5	100	50	0	0
F9	30 mM de Acetato	6,0	0	0	0	0
F10	30 mM de Acetato	6,0	150	0	0	0
F11	30 mM de Acetato	6,0	0	150	0	0
F12	30 mM de Acetato	6,0	100	50	0	0
F13	30 mM de Acetato	5,5	0	0	150	0
F14	30 mM de Acetato	5,5	0	0	0	150
F15	30 mM de Acetato	5,5	100	0	50	0
F16	30 mM de Histidina	5,0	0	0	0	0
F17	30 mM de Histidina	5,0	150	0	0	0
F18	30 mM de Histidina	5,0	0	150	0	0
F19	30 mM de Histidina	5,0	100	50	0	0
*F20	30 mM de Histidina	5,5	0	0	0	0
F21	30 mM de Histidina	5,5	150	0	0	0
F22	30 mM de Histidina	5,5	0	150	0	0
F23	30 mM de Histidina	5,5	100	50	0	0
F24	30 mM de Histidina	6,0	0	0	0	0
F25	30 mM de Histidina	6,0	150	0	0	0
F26	30 mM de Histidina	6,0	0	150	0	0
F27	30 mM de Histidina	6,0	100	50	0	0
F28	30 mM de Histidina	6,0	0	0	225	0
F29	30 mM de Histidina	5,5	0	0	0	150
F30	30 mM de Histidina	5,5	100	0	50	0

* – Amostras preparadas em triplicata

5.1 DSC (Inicial)

[00508] Os dados de DSC iniciais são mostrados na Tabela 18. Para as formulações com histidina, foi observado que valores de $T_{inicial}$ altos foram obtidos para as formulações em pH mais alto. Esta tendência correlacionou-se com os dados obtidos na triagem de linha de base inicial onde valores de $T_{inicial}$ mais altos foram observados com o aumento do pH. As formulações com histidina pH 6,0 demonstraram valores de $T_{inicial}$ mais altos quando comparados com as formulações com histidina no pH 5,0 e pH 5,5. Os valores de $T_{inicial}$ variaram de 50 a 53°C para as formulações com histidina pH 6,0. As formulações com histidina pH 5,0 variaram de 43 a 46°C ao passo que as formulações com Histidina pH 5,5 variaram de 47 a 51°C. Valores de $T_{inicial}$ altos foram observados para formulações consistindo em sacarose e sorbitol. As formulações F13, F14, F28 e F29 demonstraram valores de $T_{inicial}$ altos para formulações contendo sacarose e sorbitol. Para a formulação de acetato, uma tendência similar foi observada. As formulações em pH mais alta exibiram valores iniciais mais altos. As formulações com acetato pH 6,0 e pH 5,5 exibiram valores de $T_{inicial}$ altos com e sem a presença de NaCl e arginina. As formulações com acetato pH 6,0 variaram de 52 a 54°C ao passo que as formulações com acetato pH 5,5 variaram de 51 a 54°C. A formulação de acetato pH 5,0 exibiram a faixa $T_{inicial}$ mais baixa de 45 a 49°C.

Tabela 18. Resultados Iniciais de DSC

Amostra	Início (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
F1	49	56,247	78,649
F2	45	53,415	77,456
F3	46	52,966	76,550
F4	46	53,102	77,166
F5-1	53	59,165	79,430
F5-2	54	60,244	79,713
F5-3	54	60,170	79,640
F6	51	57,492	79,132
F7	51	57,468	78,910
F8	51	57,334	79,005
F9	54	61,042	79,703
F10	54	60,156	79,932
F11	52	59,143	79,250
F12	53	59,571	79,632
F13	53	59,566	79,848
F14	53	59,788	80,098

Amostra	Início (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
F15	51	58,002	79,642
F16	46	51,402	74,352
F17	43	49,285	72,018
F18	43	49,769	72,572
F19	43	49,311	72,060
F20-1	48	55,145	76,755
F20-2	51	56,202	77,554
F20-3	51	56,204	77,559
F21	47	53,856	75,522
F22	47	54,315	75,773
F23	47	53,491	75,178
F24	52	58,478	78,761
F25	52	57,485	78,346
F26	50	56,641	77,286
F27	50	56,766	77,640
F28	53	59,188	79,213
F29	51	56,196	77,279
F30	45	54,070	75,724

5.2 Conteúdo de Proteína pela UV A280

[00509] O Conteúdo de Proteína pelos resultados de UV A280 mostrou para todas as amostras concentrações de proteína entre 18,47 e 21,95 mg/mL (dados não mostrados). As amostras F8, F24 e F22 tiveram concentrações de proteína levemente mais baixas que é provavelmente devido à variabilidade experimental. No geral, não houve nenhuma mudança significante na concentração de proteína observada no ponto de tempo inicial.

5.3 Aparência

[00510] Todas as preparações de amostra no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C foram claras e levemente amarelas na cor. A maior parte das preparações de amostra a 5 ± 3°C não exibiu nenhuma partícula que parecesse não estar relacionada com o produto. F5-3, F7, F8, F29 e F30 contiveram umas poucas partículas. As amostras a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foram levemente amarelas na cor e claras exceto para as amostras F20-1 e F23 que foram opalescentes. As formulações a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR variaram de não ter nenhuma partícula a muitas partículas. Para as formulações com acetato, as formulações F1 não exibiram nenhuma partícula. As formulações F2, F5, F6 e F10 tiveram poucas partículas ao passo que as formulações F3, F4, F7, F8, F9, F11, F12, F13, F14 e F15 tiveram muitas partículas. Para as formulações com histidina, F17 e F26 exibiram muitas

partículas. F16, F18, F23, F25, F29 e F30 exibiram poucas partículas. O resto das formulações F19, F20, F21, F22, F24, F27 e F28 não tiveram nenhuma partícula.

5.4 pH

[00511] Os valores alvos de pH para as formulações são mostrados na Tabela 19. Para as formulações com acetato, uma mudança significante foi observada no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. A faixa para a diferença no pH para as formulações com acetato no ponto de tempo inicial e 5 ± 3°C foi 0,12 a 0,30. A mudança no pH observado nestas amostras estressadas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 0,44 a 1,01. Para as formulações com histidina, uma mudança significante no pH não foi observada no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. As diferenças no pH das formulações com histidina que foram observadas no teste de quatro semanas podem ser atribuídas à variabilidade experimental. No geral, as formulações com histidina no pH 6,0 não sofreu nenhuma mudança no pH com e sem excipientes comparadas com o resto das formulações. As formulações com acetato foram suscetíveis às mudanças no pH o que torna o acetato um componente menos adequado para o anticorpo. Mudanças significantes no pH também levariam à degradação acelerada da proteína. As formulações com histidina no pH 6,0 por outro lado mostraram ser componentes promissores. Os resultados de estabilidade explicados adiante focalizarão nas formulações com histidina (F16-F30) por causa da mudança no pH observada para as formulações com acetato.

Tabela 19. Resultados de pH para o Estudo DoE com o anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G

Amostra	pH inicial	pH a 5°C	ΔpH (5°C)	pH a 40°C	ΔpH (40°C)
F1	5,08	5,24	0,16	5,52	0,44
F2	4,95	5,07	0,12	5,88	0,93
F3	4,94	5,06	0,12	5,69	0,75
F4	4,95	5,09	0,14	5,68	0,73
F5-1	5,60	5,75	0,15	6,60	1,00
F5-2	5,60	5,75	0,15	6,57	0,97
F5-3	5,59	5,73	0,14	6,55	0,96
F6	5,44	5,58	0,14	6,35	0,91

Amostra	pH inicial	pH a 5°C	ΔpH (5°C)	pH a 40°C	ΔpH (40°C)
F7	5,51	5,66	0,15	6,27	0,76
F8	5,42	5,59	0,17	6,36	0,94
F9	6,00	6,22	0,22	6,86	0,86
F10	5,85	6,07	0,22	6,67	0,82
F11	5,86	6,16	0,30	6,66	0,80
F12	5,90	6,09	0,19	6,69	0,79
F13	5,59	5,72	0,13	6,26	0,67
F14	5,57	5,76	0,19	6,58	1,01
F15	5,45	5,61	0,16	6,17	0,72
F16	4,90	4,96	0,06	5,06	0,16
F17	4,95	5,02	0,07	5,11	0,16
F18	4,95	5,00	0,05	5,10	0,15
F19	4,96	5,03	0,07	5,06	0,10
F20-1	5,42	5,49	0,07	5,57	0,15
F20-2	5,40	5,48	0,08	5,50	0,10
F20-3	5,37	5,45	0,08	5,48	0,11
F21	5,42	5,48	0,06	5,51	0,09
F22	5,43	5,49	0,06	5,53	0,10
F23	5,41	5,46	0,05	5,54	0,13
F24	5,86	5,92	0,06	5,93	0,07
F25	5,96	5,99	0,03	6,00	0,04
F26	5,85	5,91	0,06	5,90	0,05
F27	5,92	5,92	0,00	5,88	-0,04
F28	5,86	5,89	0,03	5,91	0,05
F29	5,44	5,51	0,07	5,57	0,13
F30	5,47	5,50	0,03	5,57	0,10

5.5 Conteúdo de Proteína pela UV A280

[00512] A faixa de leituras A280 para as amostras a 5 ± 3°C foi 19,87 a 23,59 mg/mL ao passo que a faixa de leituras A280 para as amostras a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 19,81 a 26,38 mg/mL (dados não mostrados). Nenhuma mudança significante nas leituras A280 foi observada. As faixas observadas no conteúdo UV foram provavelmente devido à variabilidade experimental. Os dados não mostraram nenhuma tendência com respeito à concentração de tampão, pH e concentração de excipiente.

5.6 SEC

[00513] Os resultados de SEC para pontos de tempo de quatro semanas são mostrados na Tabela 20. Para as formulações com histidina primariamente no pH 6,0 foi observado que a presença de excipientes carregados melhorou a estabilidade da formulação. Também foi observado que o aumento no pH na presença de excipientes carregados melhorou a estabilidade das formulações com histidina. Uma diminuição na % total de impurezas para as formulações na presença de excipientes carregados foi

observada a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. A formulação F20-1 a 40 ± 2°C/75 ± 5% teve a pureza mais baixa de 84,2%. Este é um resultado inesperado e anômalo visto que as outras duas réplicas para esta formulação de ponto central são vastamente mais puras assim, esta réplica é considerada um ponto fora da curva. Para as formulações com histidina no pH 5,0 F17, F18 e F19 a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, a % de impurezas totais variou de 5,0 a 5,8%. A % de impurezas totais para as formulações com histidina no pH 5,5 F21, F22 e F23 variou de 4,1 a 7,3% ao passo que as formulações com histidina no pH 6,0 F25, F26 e F27 tiveram % de impurezas totais variando de 3,5 a 3,8%. Foi evidente que o pH mais alto levou à diminuição na % de impurezas totais e as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados mostrou melhor estabilidade. Um aumento na % de impurezas totais foi observado para as formulações com histidina contendo sacarose ou sorbitol. A % de impurezas totais foi de 3,8% a 5 ± 3°C e 6,9% a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR para as formulações no pH 6,0 sem excipientes. No geral, as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados com NaCl e arginina (Formulações F25, F26 e F27) tiveram melhor estabilidade.

Tabela 20. Resultados de SEC (F16 a F30)

Amostra	Condições	% do pico principal	% de agregados totais	% de pós monômero total	% de impurezas totais
F16	5°C	96,4	ND	3,6	3,6
	40°C	94,5	0,0	5,5	5,5
F17	5°C	96,1	ND	3,9	3,9
	40°C	94,2	0,0	5,7	5,8
F18	5°C	96,2	0,0	3,8	3,8
	40°C	94,8	0,1	5,1	5,2
F19	5°C	96,1	0,0	3,8	3,9
	40°C	95,0	0,1	4,9	5,0
F20-1	5°C	96,5	ND	3,5	3,5
	40°C	84,2	0,1	15,8	15,8
F20-2	5°C	96,8	ND	3,2	3,2
	40°C	95,9	0,2	3,9	4,1
F20-3	5°C	96,5	ND	3,5	3,5
	40°C	95,5	0,2	4,3	4,5
F21	5°C	96,4	ND	3,6	3,6
	40°C	95,1	0,2	4,7	4,9
F22	5°C	96,2	0,0	3,8	3,8
	40°C	95,9	0,3	3,8	4,1
F23	5°C	96,3	ND	3,7	3,7
	40°C	92,7	0,3	7,0	7,3

Amostra	Condições	% do pico principal	% de agregados totais	% de pós monômero total	% de impurezas totais
F24	5°C	96,2	ND	3,8	3,8
	40°C	93,1	0,1	6,8	6,9
F25	5°C	96,4	0,0	3,6	3,6
	40°C	96,5	0,2	3,3	3,5
F26	5°C	96,3	0,0	3,7	3,7
	40°C	96,3	0,2	3,5	3,7
F27	5°C	96,3	ND	3,7	3,7
	40°C	96,2	0,2	3,6	3,8
F28	5°C	96,3	ND	3,7	3,7
	40°C	95,0	0,1	4,9	5,0
F29	5°C	95,8	ND	4,2	4,2
	40°C	93,5	0,1	6,4	6,5
F30	5°C	95,5	ND	4,5	4,5
	40°C	93,4	0,1	6,4	6,6

5.7 icIEF

[00514] A heterogeneidade de carga das amostras foi determinada usando icIEF a quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR (Tabela 21). Os resultados de icIEF para as amostras a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR mostraram que a porcentagem de variantes ácidas das formulações com histidina no ponto de tempo de quatro semanas a 5°C variou de 56,2 a 58,9% para as formulações F16 a F28 (dados não mostrados). Para as formulações F29 e F30 que consistiram em sacarose e sorbitol, a porcentagem de variante ácida foi de 60,4% e 63,8%, respectivamente. Estas diferenças parecem ser significantes como observado em uma comparação de seus perfis com F25. A 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, F29 e F30 tiveram porcentagem de variantes ácidas de 45,9% e 61,6%. Para a formulação F29 consistindo em sacarose, houve um aumento significante nas variantes básicas para 32,4% a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. No ponto de tempo de quatro semanas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, todas as formulações com histidina demonstraram aumentos na porcentagem de variantes ácidas variando entre 61,6% e 71,6%. A formulação F29 mostrou porcentagem de variantes ácidas de 45,9% a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Os dados de icIEF mostraram que o pH das amostras afetou a heterogeneidade de carga. As formulações com histidina no pH 5,0 mostraram aumentos mais significantes nas variantes ácidas quando comparadas com as formulações com histidina pH 5,5 e 6,0. Para as formulações com histidina no pH 5,0, a

faixa de porcentagem de variantes ácidas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 71,3 a 71,6%. A 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, a faixa de porcentagem de variantes ácidas para histidina no pH 5,5 foi 63,5 a 67,1% ao passo que a faixa de porcentagem de variantes ácidas para histidina no pH 6,0 foi 65,3 a 66,1%. Este resultado provavelmente não é devido à desamidação porque a desamidação é conhecida ser acelerada em valores de pH mais altos e a tendência oposta é aqui observada. Através de todas as formulações, os resultados mostraram que a histidina no pH 5,5 e 6,0 foram formulações melhores do que as formulações com histidina no pH 5,0 e degradação significante foi observada nas formulações com histidina consistindo em sacarose e sorbitol.

Tabela 21. Resultados de Heterogeneidade de Carga pelo Estudo DoE de icIEF (F16 a F30)

5 ± 3°C

Designação de Amostra	% de Ácida	% Principal	% Básica
F16	56,4	40,3	3,3
F17	56,6	41,3	2,1
F18	57,0	41,1	1,9
F19	56,6	41,9	1,5
F20-1	57,8	40,3	1,9
F20-2	57,9	40,1	2,0
F20-3	57,5	40,4	2,1
F21	58,9	39,0	2,1
F22	57,0	40,0	2,9
F23	57,9	39,6	2,5
F24	56,2	41,5	2,4
F25	57,0	41,1	1,8
F26	57,1	40,9	2,0
F27	57,7	40,7	1,6
F28	57,0	40,3	2,7
F29	60,4	20,7	18,9
F30	63,8	32,6	3,7

40 ± 2°C/75 ± 5% de UR

Designação de Amostra	% de Ácida	% Principal	% de Básica
F16	71,5	25,4	3,1
F17	71,5	25,4	3,1
F18	71,6	24,9	3,5
F19	71,3	25,6	3,1
F20-1	66,4	30,5	3,1
F20-2	67,1	30,3	2,5
F20-3	67,0	30,4	2,6
F21	65,7	30,2	4,1
F22	68,0	29,0	3,1
F23	63,5	31,7	4,8

F24	65,6	32,0	2,4
F25	66,1	31,0	2,9
F26	65,3	31,9	2,8
F27	66,0	31,4	2,6
F28	65,4	31,6	3,0
F29	45,9	21,7	32,4
F30	61,6	29,5	8,9

5.8 CE-SDS Reduzida

[00515] Os resultados para CE-SDS reduzida são mostrados na Tabela 22. No ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C, todas as formulações com histidina independente do pH mostraram pureza comparável.

[00516] No ponto de tempo de quatro semanas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, os resultados mostraram um aumento nas impurezas para todas as preparações de amostra. Foi observado que as formulações no pH mais baixo exibiram mais degradação a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. As formulações com Histidina pH 5,0 mostraram uma diminuição considerável na porcentagem de pureza. A faixa para a porcentagem de pureza foi 77,5 a 82,8%. Para as formulações com histidina no pH 5,5, a porcentagem de pureza variou de 80,1 a 91,2%. Degradação significante não foi observada para as formulações com histidina no pH 6,0. A porcentagem de pureza para as formulações com histidina no pH 6,0 variou de 89,7 a 91,1% a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR no ponto de tempo de quatro semanas. Além disso, a % LMW para as amostras de histidina foi mais alta para as amostras de histidina no pH mais baixo e consideravelmente mais baixa para as formulações com histidina no pH mais alto. A faixa de % LMW para as formulações com histidina pH 5,0 foi 13,7 a 18,4%. Ao passo que as formulações com histidina pH 5,5 e 6,0 exibiram faixa de % LMW de 5,9 a 12,9% e 5,0 a 6,3%. Para as formulações com histidina no pH 6,0, também foi observado que a porcentagem de pureza não diminuiu significantemente na presença de excipientes carregados. Em todas formulações, as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados mostrou melhor pureza comparada ao resto das formulações com histidina.

Tabela 22. Resultados de Eletroforese Capilar Reduzida (F16 a F30)

Amostra	Condições	%LC	%HC	%NGHC	%Pureza	% de LMW Total	% de HMW Total
F16	5°C	31,5	62,6	0,4	94,1	2,5	3,4
	40°C	31,1	51,7	0,7	82,8	13,7	3,6
F17	5°C	30,9	61,9	0,6	92,7	3,2	4,1
	40°C	31,3	49,4	1,9	80,7	15,3	4,0
F18	5°C	30,7	61,2	0,6	91,9	3,6	4,5
	40°C	31,9	47,3	1,8	79,2	18,4	2,4
F19	5°C	31,6	60,9	0,5	92,4	3,0	4,5
	40°C	30,7	46,8	2,0	77,5	18,4	4,2
F20-1	5°C	31,4	61,5	0,6	92,9	3,4	3,7
	40°C	33,2	56,6	0,7	89,7	6,4	3,9
F20-2	5°C	32,6	62,2	0,4	94,8	2,2	3,0
	40°C	33,6	57,6	0,7	91,2	5,9	2,9
F20-3	5°C	31,9	62,6	0,4	94,5	2,4	3,2
	40°C	33,0	56,6	0,8	89,6	6,3	4,1
F21	5°C	32,1	61,1	0,5	93,2	3,3	3,5
	40°C	34,0	54,7	0,7	88,7	8,2	3,1
F22	5°C	22,5	50,2	0,4	72,7	11,9	15,4
	40°C	27,3	52,8	0,4	80,1	12,9	7,0
F23	5°C	32,7	60,2	0,5	92,9	3,8	3,2
	40°C	35,0	54,3	0,6	89,3	8,2	2,5
F24	5°C	31,5	62,5	0,4	94,0	2,4	3,7
	40°C	32,5	58,5	1,2	91,0	5,4	3,6
F25	5°C	31,6	60,0	0,6	91,6	3,5	4,8
	40°C	30,8	60,2	0,9	91,1	5,2	3,7
F26	5°C	30,6	60,7	0,6	91,3	3,8	4,9
	40°C	30,5	59,1	0,9	89,7	6,3	4,0
F27	5°C	31,4	59,9	0,6	91,3	3,9	4,8
	40°C	30,9	59,5	0,9	90,4	5,7	3,9
F28	5°C	31,7	60,9	0,6	92,6	3,3	4,1
	40°C	32,8	58,0	0,8	90,8	5,0	4,2
F29	5°C	46,6	35,3	0,4	81,9	16,0	2,1
	40°C	51,0	28,3	0,8	79,3	18,0	2,7
F30	5°C	36,0	52,8	0,5	88,8	7,9	3,4
	40°C	36,6	48,8	0,8	85,5	11,8	2,7

5.9 CE-SDS Não Reduzida

[00517] Os resultados para CE-SDS não reduzida são mostrados na Tabela 23. Os resultados obtidos a partir das formulações com acetato (F1 a F15) não serão considerados devido à mudança no pH observada para estas formulações. % de HMW de impurezas significantemente alta foi observada para formulações consistindo em arginina a 5 ± 3°C, isto é, as formulações F18, F19, F22, F23, F26 e F27. Este aumento nas impurezas não foi observado para as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de NaCl (F25), isto é, as formulações F17, F21 e F25. Resultados anteriores sugeriram que as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados (NaCl e arginina) fossem condições ótimas. Os resultados obtidos

a partir dos dados de CE-SDS não reduzida confirmam que uma formulação de histidina pH 6,0 com NaCl é uma melhor escolha do que a histidina pH 6,0 com arginina.

Tabela 23. Resultados de CE-SDS Não Reduzida (F16 a F30)

Amostra	Condições	%LMW	% pico principal	% HMW	% de impurezas totais
F16	5°C	6,9	92,2	1,0	7,8
	40°C	12,5	86,4	1,0	13,6
F17	5°C	6,9	92,1	1,0	7,9
	40°C	19,3	78,6	2,2	21,4
F18	5°C	6,4	73,4	20,3	26,6
	40°C	29,8	63,8	6,4	36,2
F19	5°C	7,5	75,8	16,7	24,2
	40°C	27,3	63,8	8,9	36,2
F20-1	5°C	8,0	91,1	0,9	8,9
	40°C	16,1	82,7	1,2	17,3
F20-2	5°C	8,0	91,3	0,7	8,7
	40°C	15,4	83,7	0,9	16,3
F20-3	5°C	7,9	91,2	0,9	8,8
	40°C	16,2	82,9	0,9	17,1
F21	5°C	11,0	87,9	1,1	12,1
	40°C	20,4	78,4	1,2	21,6
F22	5°C	6,5	80,7	12,7	19,3
	40°C	11,7	82,1	6,2	17,9
F23	5°C	10,1	77,0	12,9	23,0
	40°C	21,8	72,6	5,7	27,4
F24	5°C	7,2	92,0	0,8	8,0
	40°C	12,9	86,1	0,9	13,9
F25	5°C	6,7	92,2	1,0	7,8
	40°C	8,7	90,2	1,2	9,8
F26	5°C	6,0	71,5	22,5	28,5
	40°C	8,9	90,0	1,1	10,0
F27	5°C	6,4	83,2	10,4	16,8
	40°C	9,4	83,5	7,1	16,5
F28	5°C	7,2	92,0	0,8	8,0
	40°C	13,3	86,0	0,8	14,0
F29	5°C	63,9	35,7	0,4	64,3
	40°C	61,2	35,5	3,3	64,5
F30	5°C	31,4	68,1	0,5	31,9
	40°C	30,3	69,1	0,6	30,9

5.10 DLS

[00518] As formulações com acetato não estão sendo consideradas devido à mudança no pH observada nestas formulações. Com base nos dados de DLS (não mostrado), foi observado que o pH mais baixo levou à polidispersividade alta nas formulações com histidina. as formulações com histidina pH 5,0 F17, F18 e F19 tiveram aumentos significantes na polidispersividade. Por exemplo, a %Pd da formulação F17 a 5 ± 3°C foi 10,2

e 7,0 e aumentou para 20,8 e 18,7 depois de quatro semanas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Similarmente as formulações com histidina pH 5,5 F21, F22 e F23 tiveram %Pd aumentada a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Por exemplo, a formulação F23 teve %Pd de 6,3 e 10,4 a 5 ± 3°C. A %Pd aumentou para 17,1 e 21,7 a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. A maioria das formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados (NaCl e arginina) foram resistentes às mudanças na polidispersividade em ambas as condições de estresse. As formulações F25, F26 e F27 não mostraram aumentos significantes na %Pd. Por exemplo a formulação F25 mostrou %Pd de 9,4 e 8,9 a 5 ± 3°C. A % Pd a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 8,3 e 10,2. Adicionalmente, as formulações na presença de sacarose (F19) exibiram alta polidispersividade em ambas as condições. A %Pd para F29 foi 23,7 e 23,4 a 5 ± 3°C ao passo que a %Pd a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 23,2. A % Pd para a condição de 5 ± 3°C já foi bastante alta para este método indicando, já, a presença de agregados de alta ordem. O fato de que a %Pd não mudou em temperaturas mais alta não é assim surpreendente. A alta polidispersividade também foi observada nos dados de DLS da triagem biofísica da linha de base inicial. A %Pd similarmente alta foi observada para a formulação com Sorbitol (F30). Interessantemente, F28 que contém sorbitol e NaCl não mostrou uma %Pd alta que adicionalmente sustente a noção de que NaCl seja uma escolha ideal como um componente para uma formulação ótima. A % Pd alta não foi observada para a formulação F28 no ponto de tempo de quatro semanas. A %Pd para a formulação F30 a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 15,4 e 14,2. No geral, as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados mostrou a mudança mínima na polidispersividade. As formulações com histidina contendo tanto sacarose quanto sorbitol no pH 5,5 exibiu %Pd alta em ambas as condições de estresse.

6. Conclusões

[00519] Com base nos resultados obtidos a partir do teste analítico de

anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G nas várias formulações listadas na Tabela 17, a formulação F25 (30 mM de histidina, 150 mM de NaCl pH 6,0) foi a formulação ótima para esta molécula.

[00520] Os resultados de triagem biofísica de linha de base inicial sugeriram que as formulações com acetato e histidina no pH 5,5 foram condições ótimas de tampão/pH. Adicionalmente, a arginina e NaCl foram a melhor escolha de excipientes quando comparada ao sorbitol e sacarose. Os estudos de tensoativo e crioprotetor indicaram que nem o PS-80 nem a sacarose foram requeridos para realçar a estabilidade da formulação. Para o estudo de estabilidade DoE, os resultados de DSC iniciais confirmaram que as formulações com 30 mM de histidina no pH 6,0 tiveram valores de temperatura de fusão $T_{inicial}$ mais altas. Mudanças significantes no pH foram observadas em todas as formulações com 30 mM de acetato. As formulações com histidina no pH 6,0 não exibiram nenhuma mudança significante no pH na estabilidade em quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Os dados de SEC demonstraram que a histidina pH 6,0 na presença de excipientes carregados conferiu o máximo de estabilidade para IgG1-hDR5-05-E430G. Os resultados de icIEF mostraram que as amostras no pH 5,5 e 6,0 foram mais resistentes às mudanças na heterogeneidade de carga. Os mesmos também mostraram que as formulações na presença de sacarose e sorbitol exibiram o máximo de degradação. Os dados de DLS mostraram que as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados tiveram a mudança mínima na polidispersividade. Os resultados para CE-SDS reduzida mostrou que as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados foram as melhores das formulações. Os dados de CE-SDS não reduzida mostraram que as amostras na presença de arginina exibiram %HMW alto de impurezas que não foram presentes nas amostras contendo NaCl. No geral, a somatória dos dados disponíveis sustenta a escolha de uma formulação contendo histidina e cloreto de sódio para este

anticorpo.

Exemplo 55: Desenvolvimento de Formulação de Anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G

Materiais, equipamento e métodos

[00521] Os materiais, equipamento e métodos usados foram os mesmos como no Exemplo 54, exceto que o anticorpo foi IgG1-hDR5-01-G56T-E430G ao invés de IgG1-hDR5-05- E430G.

Resultados

1. Triagem Biofísica de Linha de Base Inicial

[00522] A triagem biofísica inicial foi realizada para selecionar combinações de tampão/pH para avançar na triagem de excipiente. DSC e DLS foram usadas para avaliar a estabilidade térmica. A análise de DSC proveu as temperaturas de fusão (T_m1 e T_m2) junto com a $T_{inicial}$. A análise de DLS proveu informação sobre a polidispersividade e raio hidrodinâmico da proteína.

[00523] Uma tendência nos dados de DSC foi observada através da faixa de formulações. Os valores de $T_{inicial}$ variaram entre 46°C e 55°C (dados não mostrados). Os valores de $T_{inicial}$ mais altos indicam maior estabilidade térmica, assim os tampões de pH extremamente baixos e altos (glutamato, acetato, citrato e fosfato), tendo os valores de $T_{inicial}$ mais baixos, não são ótimos. Os valores de $T_{inicial}$ dos tampões de succinato e histidina assim como acetato pH 5,5 indicaram que estes dois tampões entre pH 5,5 e 6,5 conferem maior estabilidade térmica.

[00524] Tendências foram observadas através de uma faixa de tampões de pH crescente quanto aos dados de DLS (dados não mostrados). No geral, níveis mais altos de polidispersividade foram observados aumentar o pH através da faixa de tampões, indicando níveis mais altos de agregação para tampões de pH mais alto. Tampões de Glutamato e Acetato em ambos de seus respectivos níveis de pH tiveram os níveis mais baixos de polidispersividade

(%Pd entre 3,5% e 7,6%). Os tampões remanescentes, com a exceção de 25 mM de Histidina pH 5,5 (6,9% %Pd), tiveram os níveis mais altos de polidispersividade, variando entre 13,8% e 23,3%.

[00525] Os resultados dos dados DLS da triagem biofísica inicial correlacionaram-se fortemente com os resultados classificatórios de formulação obtidos de DSC para algumas formulações. Os tampões de Fosfato e Citrato exibiram altos graus de %Pd (14,1% a 18,9%) assim como valores de $T_{inicial}$ relativamente mais baixos (48°C a 51°C). Devido à evidência de agregação e instabilidade térmica, estas duas formulações foram eliminadas de estudo adicional. As outras formulações (glutamato, acetato, succinato, histidina) não tiveram correlações fortes entre os dados de DSC e DLS. Por exemplo, 25 mM de histidina pH 6,0 e 6,5 tiveram %Pd de 18,5% e 23,3%, respectivamente, entretanto estes mesmos dois tampões exibiram alguns dos valores de $T_{inicial}$ mais altos, 53°C e 55°C, respectivamente. Os tampões tanto de glutamato quanto de acetato pH 4,5 tiveram valores de $T_{inicial}$ um tanto mais baixos, entre 46°C e 50°C, mas tiveram os valores de %Pd mais baixos (entre 3,5% a 7,6%). Finalmente, o tampão de succinato no pH 5,5 e 6,0 exibiu valores de $T_{inicial}$ mais altos, 50°C e 54°C, respectivamente, mas foram observados ter níveis altos de polidispersividade (13,8% e 14,7%, respectivamente). Devido aos resultados inconclusivos nas formulações tampão anteriormente mencionadas, todos os quatro tampões (glutamato, acetato, succinato e histidina) foram usados na triagem biofísica com excipientes para exame adicional.

2. Triagem Biofísica com Excipientes

[00526] As formulações selecionadas acima foram triadas na presença de 150 mM de arginina, cloreto de sódio, sacarose ou sorbitol. Os dados são mostrados na Tabela 24.

[00527] As tendências foram evidentes na DSC e os dados para a triagem biofísica de anticorpo com excipientes. Geralmente, as formulações

com excipientes carregados tiveram valores de $T_{inicial}$ mais baixos do que as formulações com sacarose ou sorbitol. Houve também um aumento geral nos valores de $T_{inicial}$ (variando entre 46°C e 55°C) em DSC conforme o pH aumentou através da faixa de tampões, indicando que o pH aumentado do tampão conferiu maior estabilidade térmica ao anticorpo.

[00528] Uma tendência geral foi observada também através dos dados de DLS. De acordo com estes dados, as formulações contendo excipientes carregados (arginina e NaCl) foram verificados ter níveis mais baixos de polidispersividade, assim níveis mais baixos de agregação evidente, comparados com as formulações contendo açúcares (sorbitol e sacarose). Estas formulações contendo açúcares não apenas tiveram níveis mais altos de polidispersividade, mas em alguns casos contiveram duas populações proteináceas distintas, como indicado pela designação multimodal, para tampão de acetato contendo sorbitol e tampão de histidina contendo sorbitol e sacarose. A exceção para esta tendência foi encontrada em todas as formulações com 25 mM de succinato, que todas mostraram altos níveis de polidispersividade independente da presença de excipientes carregados ou de açúcar.

[00529] Devido aos valores de $T_{inicial}$ significantemente mais baixos para glutamato em pH mais baixo, assim como o potencial para hidrólise em pH ácido baixo da espinha dorsal da proteína, os tampões de glutamato foram excluídos do estudo adicional. Além disso, o tampão de succinato foi excluído de exame adicional devido aos altos níveis de polidispersividade entre todas das suas formulações, incluindo aquelas com excipientes carregados. Os dados de triagem biofísica portanto sugere que as formulações com 25 mM de acetato e histidina no pH 5,5 na presença de cloreto de sódio e arginina foram melhores candidatos para desenvolvimento de formulação adicional.

Tabela 24. Resultados da Triagem de Tampão da Linha de Base com Excipientes (DSC e DLS)

DSC

Formulação	Excipiente	Tampão	Início (°C)	T_m1 (°C)	T_m2 (°C)
1A	150 mM de Arginina	25 mM de Glutamato pH 5,0	47	54,91	82,06
1B	150 mM de NaCl		46	54,57	82,03
1C	150 mM de Sorbitol		49	56,24	84,07
1D	150 mM de Sacarose		50	58,11	84,38
2A	150 mM de Arginina	25 mM de Acetato pH 5,5	51	58,26	83,40
2B	150 mM de NaCl		51	58,86	83,52
2C	150 mM de Sorbitol		53	60,61	84,82
2D	150 mM de Sacarose		54	61,21	85,07
3A	150 mM de Arginina	25 mM de Histidina pH 5,5	47	54,82	80,39
3B	150 mM de NaCl		51	59,02	83,27
3C	150 mM de Sorbitol		55	62,77	84,99
3D	150 mM de Sacarose		55	63,23	85,48
4A	150 mM de Arginina	25 mM de Succinato pH 6,0	53	60,39	83,93
4B	150 mM de NaCl		54	61,21	84,29
4C	150 mM de Sorbitol		54	61,96	84,60
4D	150 mM de Sacarose		55	62,49	85,16

DLS

Formulação	Tampão	pH	Excipiente	%Pd	Raio (nm)
1A	Glutamato	5,0	Arginina	6,1	5,632
1A		5,0		6,8	5,595
1B		5,0	NaCl	9,3	5,570
1B		5,0		10,2	5,535
1C		5,0	Sorbitol	9,4	3,834
1C		5,0		16,8	3,903
1D		5,0	Sacarose	22,7	5,408
1D		5,0		22,6	5,338
2A	Acetato	5,5	Arginina	12,8	5,804
2A		5,5		10,8	5,967
2B		5,5	NaCl	8,9	5,611
2B		5,5		8,3	5,621
2C		5,5	Sorbitol	Multimodal	9,050
2C		5,5		Multimodal	8,351
2D		5,5	Sacarose	23,1	5,213
2D		5,5		23,9	5,266
3A	Histidina	5,5	Arginina	8,0	5,920
3A		5,5		8,4	5,717
3B		5,5	NaCl	8,9	5,631
3B		5,5		9,3	5,663
3C		5,5	Sorbitol	Multimodal	47,547
3C		5,5		Multimodal	46,646
3D		5,5	Sacarose	Multimodal	8,026
3D		5,5		Multimodal	5,962
4A	Succinato	6,0	Arginina	20,8	6,375
4A		6,0		19,7	6,185
4B		6,0	NaCl	14,3	6,398
4B		6,0		13,2	6,458
4C		6,0	Sorbitol	16,9	6,956
4C		6,0		17,6	6,915
4D		6,0	Sacarose	26,7	7,972
4D		6,0		27,0	8,064

3. Estudo de Solubilidade

[00530] O anticorpo foi formulado a 40 mg/mL na sua formulação base

(30 mM de histidina, pH 5,5) com quatro concentrações diferentes de NaCl (0, 25, 50 e 100 mM de NaCl) para determinar o efeito sobre a solubilidade e separação de fase. As amostras foram armazenadas a -5 ± 3°C durante 24 h em uma prateleira liofilizadora pré-resfriada. Depois de 24 horas, o conjunto de amostras foram testadas pela aparência. Nenhuma separação de fase foi observada em qualquer uma das amostras preparadas.

4. Triagem de Tensoativo

[00531] O anticorpo foi formulado em 30 mM de histidina, pH 5,5 na presença de 0, 0,03 ou 0,06% p/v de Tween-80 e estressado com três ciclos de congelamento-descongelamento. Amostras idênticas foram agitadas durante período de 48 horas. Depois do estresse da amostra, o conjunto de amostras foram testadas pela aparência, A280, SEC, CE-SDS reduzida e CE-SDS não reduzida.

4.1 Aparência

[00532] Nenhuma diferença visual foi observada entre as amostras de qualquer uma das amostras no estudo de triagem de tensoativo. Todas as amostras foram de líquidos levemente amarelos, opalescentes e livres de particulados.

4.2 Concentração de proteína pela A280

[00533] As concentrações de anticorpo obtidas pela análise UV não foram significantemente diferentes entre as amostras agitadas, congeladas-descongeladas e de controle com concentrações diferentes de PS-80 e variou entre 17,80 e 21,32 mg/mL (dados não mostrados).

4.3 Cromatografia por exclusão de tamanho

[00534] A pureza monomérica não diferiu significantemente e o crescimento de novos picos não foi observado para nenhuma das amostras de triagem de tensoativo. A pureza de todas as amostras foi entre 98,4 e 98,7% (dados não mostrados).

4.4 Eletroforese Capilar Reduzida - Dodecil sulfato de sódio

[00535] A pureza (Cadeia leve e cadeia pesada %) não diferiu significantemente e nenhum pico novo foi observado para qualquer das amostras de triagem de tensoativo. A pureza de todas as amostras foi 95,4 – 95,8% (dados não mostrados).

4.5 Eletroforese Capilar Não Reduzida - Dodecil sulfato de sódio

[00536] A pureza do pico principal não diferiu significantemente e nenhum pico novo foi observado para nenhuma das amostras de triagem de tensoativo. A pureza de todas as amostras foi entre 91,2% e 91,3% (dados não mostrados).

4.6 Conclusões da Triagem de Tensoativo

[00537] Nenhuma mudança na aparência, concentração de proteína ou pureza foi observada entre as amostras não estressadas e estressadas contendo concentrações de 0, 0,03 e 0,06% de PS-80. Estes dados indicam que os tensoativos não realçam a estabilidade do anticorpo.

5. Triagem de crioprotetor

[00538] Na triagem de crioprotetor, o anticorpo foi formulado em 30 mM de histidina, pH 5,5 com três concentrações diferentes (0, 5 ou 10% p/v) de sacarose e estressado com três ciclos de congelamento-descongelamento. Amostras idênticas foram agitadas durante um período de 48 horas. Depois de estressar a amostra, o conjunto de amostras foi testado pela aparência, A280, SEC, CE-SDS reduzida e CE-SDS não reduzida.

5.1 Aparência

[00539] Nenhuma diferença visual foi observada entre as amostras contendo 0%, 5% ou 10% de sacarose estressadas com três ciclos de congelamento-descongelamento e agitadas durante um período de 48 horas. Todas as amostras foram de líquidos levemente amarelos, opalescentes e livres de particulados visíveis.

5.2 Concentração de proteína pela A280

[00540] As concentrações de anticorpo obtidas pela análise UV não

foram significantemente diferentes. As concentrações variaram entre 19,03 e 22,92 mg/mL (dados não mostrados).

5.3 Cromatografia por exclusão de tamanho

[00541] A pureza monomérica não diferiu significantemente e o crescimento de novos picos não foi observada para nenhuma das amostras de triagem de criprotetor. A pureza de todas as amostras foi entre 98,4 e 99,0% (dados não mostrados).

5.4 Eletroforese capilar reduzida - Dodecil sulfato de sódio

[00542] A pureza (Cadeia leve e cadeia pesada %) não diferiu significantemente e o crescimento de novos picos não foi observado para nenhuma das amostras de triagem de criprotetor. A pureza de todas as amostras foi entre 95,1 e 95,7% (dados não mostrados).

5.5 Eletroforese Capilar Não Reduzida - Dodecil sulfato de sódio

[00543] A pureza do pico principal não diferiu significantemente e nenhum crescimento de novos picos foi observada para nenhuma das amostras de triagem de criprotetor. A pureza de todas as amostras foi entre 90,3 e 91,9% (dados não mostrados).

5.6 Conclusões da Triagem de Crioprotetor

[00544] Nenhuma mudança significante na aparência, concentração de proteína ou pureza foram observadas entre as amostras não estressadas e estressadas contendo concentrações de 0%, 5% e 10% de sacarose. Estes dados indicaram que os crioprotetores não realçaram a estabilidade do anticorpo.

6. Estudo de Estabilidade DOE

[00545] O planejamento e metodologia de estudo foram idênticos àquele usado no Exemplo 54. Ver a Tabela 17 acima para a listagem de todas as formulações sob exame.

6.1 DSC (Inicial)

[00546] Os dados de DSC inicial são mostrados na Tabela 25. Para as

formulações com histidina, foi observado que valores de $T_{inicial}$ altos foram obtidos para as formulações no pH mais alto. Esta tendência correlacionou-se com os dados obtidos na triagem de linha de base inicial onde valores de $T_{inicial}$ mais altos foram observados com pH crescente. As formulações com histidina no pH 6,0 demonstraram valores de $T_{inicial}$ mais altos quando comparados com as formulações com histidina no pH 5,0 e pH 5,5. Os valores de $T_{inicial}$ variaram de 47 a 52°C para as formulações com histidina no pH 6,0. As formulações com histidina pH 5,0 variaram de 42 a 45°C ao passo que as formulações com histidina pH 5,5 variaram de 46 a 50°C. Os valores de $T_{inicial}$ mais altos foram observados para as formulações consistindo em sacarose e sorbitol. As formulações F13, F14, F28 e F29 exibiram valores de $T_{inicial}$ altos para as formulações consistindo em sacarose e sorbitol. Isto é esperado devido aos efeitos que os osmólitos têm sobre os estados dobrados das proteínas. Para as formulações com acetato, uma tendência similar foi observada. As formulações no pH mais alto exibiram valores iniciais mais altos. As formulações com acetato pH 6,0 e pH 5,5 exibiram valores de $T_{inicial}$ altos com e sem a presença de NaCl e arginina. As formulações com acetato pH 6,0 variaram de 52 a 54°C ao passo que as formulações com acetato pH 5,5 variaram de 49 a 53°C. A formulação com acetato pH 5,0 exibiu a faixa de $T_{inicial}$ mais baixa de 45 a 49°C.

Tabela 25. Resultados de DSC inicial das amostras de anticorpo para o estudo DOE

Amostra	Início (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
F1	49	56,371	82,778
F2	46	53,488	80,745
F3	45	53,238	80,319
F4	45	53,303	80,595
F5-1	52	59,100	83,374
F5-2	52	59,408	83,415
F5-3	53	59,698	83,443
F6	50	57,612	82,467
F7	49	56,997	81,919
F8	50	57,382	82,267
F9	54	60,791	83,458
F10	53	60,307	83,024
F11	52	59,278	82,322
F12	52	59,755	82,753

F13	52	59,509	83,793
F14	53	59,836	83,895
F15	51	58,225	82,806
F16	45	51,485	78,445
F17	42	49,410	76,156
F18	42	49,861	76,695
F19	42	49,405	76,182
F20-1	49	55,333	80,690
F20-2	49	55,770	80,855
F20-3	49	55,866	80,955
F21	50	56,736	80,215
F22	46	53,436	78,657
F23	46	53,330	78,762
F24	52	58,411	82,427
F25	47	54,218	79,357
F26	50	56,572	80,712
F27	50	56,967	80,787
F28	51	59,198	82,956
F29	49	56,095	80,964
F30	46	53,950	79,083

6.2 UV (Inicial)

[00547] A faixa de concentrações de proteína para o ponto de tempo inicial foi entre 18,52 e 21,86 mg/mL (dados não mostrados). No geral, não houve nenhuma mudança significante na concentração de proteína observada no ponto de tempo inicial.

6.3 Aparência

[00548] A maior parte das preparações de amostra no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C foram claras e levemente amarelas na cor. As amostras F28 e F29 (que contiveram sorbitol ou sacarose) foram opalescentes a 5 ± 3°C. A maior parte das preparações de amostra tanto em tampão de acetato quanto de histidina a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR exibiram poucas partículas. As amostras em ambas as condições foram levemente amarelas e claras com a exceção de algumas amostras preparadas em histidina. Para a condição de 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, as formulações com histidina F20-1, F20-2, F20-3, F24, F28, F29 e F30, foram opalescentes. Estas formulações não tiveram excipientes ou tiveram sacarose ou sorbitol.

6.4 pH

[00549] Para as formulações com acetato, uma mudança significante no pH foi observada no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ±

2°C/75 ± 5% de UR (dados não mostrados). A faixa para a diferença no pH para as formulações com acetato no ponto de tempo inicial e 5 ± 3°C foi 0,10 a 0,29. A mudança no pH observada nestas amostras estressadas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 0,07 a 1,30. Para as formulações com histidina, uma mudança no pH foi observada no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, mas as mudanças foram muito menores do que aquelas das amostras com acetato. A faixa para a diferença no pH para as formulações com histidina no ponto de tempo inicial e 5 ± 3°C foi 0,02 a 0,16. Este tipo de mudança pode ser designado para a variabilidade de método para amostras de volume pequeno. A mudança no pH observada nestas amostras estressadas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 0,02 a 0,94.

[00550] Mudanças significantes no pH também levariam à degradação acelerada da proteína. As formulações com acetato foram suscetíveis às mudanças no pH em um nível muito mais alto comparado com as formulações com histidina, que torna o acetato um componente inadequado para este anticorpo. Os resultados de estabilidade explicados adiante focalizarão nas formulações com histidina (F16 a F30) por causa da mudança de pH observada para as formulações de acetato.

6.5 Conteúdo de Proteína pela UV A280

[00551] A faixa de determinação do conteúdo de proteína pelas leituras de A280 para as amostras de 5 ± 3°C foi 14,66 a 21,70 mg/mL ao passo que a faixa de leituras A280 para as de 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 18,12 a 40,42 mg/mL (dados não mostrados). Mudanças significantes nas leituras A280 foram observadas para F20-1, F20-2, F20-3, F24 e F28 a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Estas mesmas amostras foram observadas ser opalescentes no teste de aparência. Devido ao aumento na concentração de proteína observada, é provável que estes resultados sejam devido a um absorvedor de UV não relacionado com o produto inflacionando as concentrações UV aparentes.

6.6 Cromatografia por exclusão de tamanho

[00552] Os resultados de SEC para os pontos de tempo de quatro semanas são mostrados na Tabela 26. Mudanças significantes ocorreram nas formulações com histidina que foram verificadas terem sido da alta concentração de proteína e opalescentes na aparência (F20-1, F20-2, F20-3, F24 e F28, F29, F30). Para estas amostras, um pico absorvente de UV significante foi observado no fluxo da fase móvel. Estes dados de SEC, assim como outras análises de suporte já debatidas, indicam que estas formulações contiveram um componente absorvente de UV não relacionado com o produto. Em condições de estresse em alta temperatura, é possível que a formulação de histidina sem excipientes carregados degrade e atue como este componente absorvedor de UV. Para as formulações com histidina foi observado que a presença de excipientes carregados melhorou a estabilidade da formulação. Também foi observado que um aumento no pH melhorou a pureza das formulações com histidina. Uma diminuição na % de impurezas totais para as formulações na presença de excipientes carregados foi observada a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Para as formulações com histidina pH 5,0 F17, F18 e F19 a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, a % de impurezas totais variou de 4,2 a 4,9%. A % de impurezas totais para as formulações com histidina no pH 5,5 F21, F22 e F23 variou de 3,6 a 5,6% ao passo que as formulações com histidina no pH 6,0 F25, F26 e F27 tiveram % de impurezas totais variando de 3,2 a 3,4%. No geral, pH mais alto levou à diminuição na % de impurezas totais e as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados mostraram melhor estabilidade. No geral, as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados com NaCl e arginina tiveram melhor estabilidade.

Tabela 26. Resultados de Tendência de SEC no Estudo DoE - 5 ± 3°C (F16 a F30)

Amostra	% Pico principal	% Total de Agregado	% Total Pós Monômero	% Total de Impurezas
F16	98,2	ND	1,8	1,8
F17	97,8	ND	2,2	2,2
F18	97,8	ND	2,2	2,2
F19	97,8	ND	2,2	2,2

F20-1	95,7	ND	4,3	4,3
F20-2	95,9	ND	4,2	4,2
F20-3	95,8	ND	4,2	4,2
F21	97,6	ND	2,4	2,4
F22	97,8	ND	2,2	2,2
F23	97,8	ND	2,2	2,2
F24	97,9	ND	2,1	2,1
F25	97,9	ND	2,1	2,1
F26	97,8	ND	2,2	2,2
F27	97,6	ND	2,4	2,4
F28	90,9	ND	9,1	9,1
F29	95,7	ND	4,3	4,3
F30	97,9	ND	2,1	2,1

Tabela 26. (continuação) 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR (F16 a F30)

Amostra	% Pico Principal	% Total de Agregado	% Total de Pós Monômero	% Total de Impurezas
F16	95,9	0,3	3,8	4,1
F17	95,8	ND	4,2	4,2
F18	95,1	0,4	4,5	4,9
F19	95,3	0,5	4,2	4,7
F20-1	57,2	0,4	42,4	42,8
F20-2	59,6	0,3	43,6	44,0
F20-3	56,0	0,4	43,6	44,0
F21	96,2	1,1	2,6	3,7
F22	96,4	0,9	2,6	3,6
F23	94,4	1,0	4,6	5,6
F24	62,6	0,6	36,8	37,4
F25	96,7	0,9	2,4	3,3
F26	96,8	0,7	2,5	3,2
F27	96,6	0,8	2,6	3,4
F28	40,7	0,2	59,1	59,3
F29	37,0	0,1	62,9	63,0
F30	62,7	0,3	36,9	37,3

6.7 Focalização Isoelétrica Capilar com Imageamento

[00553] A heterogeneidade de carga das amostras de anticorpo foi determinada usando icIEF (Tabela 27). Com base nos dados, a porcentagem de Pico Principal das formulações com histidina no ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C variou de 45,6 a 47%. A 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, as formulações consistiram em sorbitol ou sacarose F28, F29 e F30 tiveram aumento significante na porcentagem de variantes básicas de 11,2%, 19,0% e 11,5%, respectivamente. No ponto de tempo de quatro semanas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, todas as formulações com histidina demonstraram aumentos na porcentagem de variantes básicas. Os dados de icIEF mostraram que o pH das amostras afetou a heterogeneidade de carga significantemente. As formulações com histidina no pH 5,0 mostraram mais aumentos significantes nas variantes básicas quando comparadas com as formulações com histidina

pH 5,5 e 6,0. Para as formulações de histidina pH 5,0, a faixa de porcentagem de variantes básicas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR foi 6,3 a 7,2%. A 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, a faixa de porcentagem de variantes básicas para histidina pH 5,5 foi 5,5 a 6,4% ao passo que a faixa de porcentagem de variantes básicas para a formulação de histidina pH 6,0 foi 4,4 a 4,7%. Este resultado provavelmente não é devido à desamidação porque a desamidação é conhecida ser acelerada em valores de pH mais altos e a tendência oposta é aqui observada. A proliferação de variantes básicas pode ser devido a outras impurezas como formando espécies HMW ou LMW. Através de todas as formulações, os resultados mostraram que as formulações de histidina pH 6,0 foram melhores do que as formulações de histidina pH 5,0 e pH 5,5 e degradação significante foi observada nas formulações com histidina consistindo em sacarose e sorbitol.

Tabela 27. Resultados de Heterogeneidade de Carga – Estudo DoE (F16 a F30)

5 ± 3°C

Designação de Amostra	% Ácida	% Principal	% Básica
F16	51,2658	45,7214	3,0129
F17	50,7337	46,3536	2,9128
F18	49,6343	47,2554	3,1103
F19	51,0018	46,0089	2,9892
F20-1	50,2246	46,6850	3,0903
F20-2	50,7704	46,4691	2,7605
F20-3	50,5080	46,5530	2,9389
F21	50,5807	46,5006	2,9188
F22	51,3396	45,5742	3,0860
F23	50,6815	46,3329	2,9856
F24	50,5549	46,4321	3,0129
F25	51,1597	46,0433	2,7969
F26	50,7182	46,2823	2,9996
F27	50,1041	46,9935	2,9024
F28	50,4796	46,7715	2,7489
F29	50,7420	46,5580	2,7000
F30	50,6776	46,1046	3,2178

40 ± 2°C/75 ± 5% de UR

Designação de Amostra	% Ácida	% Principal	% Básica
F16	60,7833	32,8678	6,3489
F17	61,4471	32,0916	6,4613
F18	60,7822	32,1308	7,0869
F19	60,9821	31,8441	7,1738
F20-1	58,4109	35,2051	6,3840
F20-2	57,4696	36,9132	5,6171

F20-3	57,7045	36,2584	6,0370
F21	59,6823	34,7816	5,5361
F22	59,0513	35,3566	5,5921
F23	58,8688	35,7943	5,3369
F24	59,7325	35,8236	4,4438
F25	59,4254	35,9883	4,5862
F26	58,3393	36,9718	4,6889
F27	58,5474	37,0873	4,3652
F28	58,2504	30,5135	11,2363
F29	53,1306	27,8952	18,9743
F30	55,7556	32,7219	11,5222

6.8 Eletroforese capilar reduzida – Dodecil sulfato de sódio

[00554] Os resultados para a eletroforese capilar reduzida são mostrados na Tabela 28. No ponto de tempo de quatro semanas a 5 ± 3°C, todas as formulações com histidina independente do pH mostrou pureza comparável, entretanto as formulações com sacarose e sorbitol foram um tanto menos puras.

[00555] No ponto de tempo de quatro semanas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, os resultados mostraram um aumento nas impurezas para todas as preparações de amostra. Foi observado que as formulações em pH mais baixo exibiram mais degradação a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. As formulações com histidina pH 5,0 mostraram uma diminuição considerável na porcentagem de pureza. A faixa para a porcentagem de pureza foi 86,3 a 88,9%. Para as formulações com histidina no pH 5,5, a porcentagem de pureza variou de 85,0 a 92,3%. Significantemente menos degradação foi observada para as formulações com histidina no pH 6,0. A porcentagem de pureza para as formulações com histidina no pH 6,0 variou de 90,1 a 93,1% a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR no ponto de tempo de quatro semanas. Além disso, a % de LMW para as amostras de histidina foi mais alta para as amostras de histidina em pH mais baixo e consideravelmente mais baixa para formulações com histidina no pH mais alto. A faixa de % de LMW para formulações com histidina pH 5,0 foi 8,3 a 11,0%, ao passo que as formulações com Histidina pH 5,5 e 6,0 exibiram faixa de % de LMW de 5,4 a 12,1% e 4,0 a 6,6%. Para as formulações com histidina no pH 6,0, também foi observado que a porcentagem de pureza não diminuiu significantemente na presença de

excipientes carregados. Através de todas as formulações, as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados com NaCl e arginina mostraram melhor pureza comparada com o resto das formulações com histidina.

Tabela 28. Resultados da Eletroforese Capilar Reduzida – Estudo DoE (F16 a F30)

5 ± 3°C

Designação de Amostra	%LC	%HC	%NGHC	%Pureza	% de LMW Total	% de HMW Total
F16	32,4	63,1	0,8	95,5	2,1	2,5
F17	31,6	64,0	0,8	95,6	2,0	2,4
F18	31,4	63,8	0,8	95,2	2,3	2,5
F19	31,5	63,5	0,8	95,0	2,4	2,6
F20 rep 1	31,9	63,4	0,8	95,3	2,2	2,5
F20 rep 2	32,5	63,4	0,7	95,9	1,8	2,3
F20 rep 3	32,5	63,5	0,7	96,0	1,8	2,3
F21	31,9	64,1	0,7	96,0	1,7	2,3
F22	31,8	64,2	0,7	95,9	1,8	2,2
F23	31,9	64,0	0,7	95,9	1,9	2,2
F24	32,8	62,8	0,7	95,6	1,9	2,5
F25	32,0	63,7	0,7	95,7	1,9	2,4
F26	31,8	64,0	0,7	95,7	1,9	2,4
F27	31,7	63,8	0,8	95,5	2,1	2,4
F28	32,5	62,8	0,8	95,3	2,2	2,5
F29	32,3	62,6	0,8	94,9	2,7	2,5
F30	31,8	63,2	0,7	95,0	2,1	3,0

Tabela 28. (continuação) 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR

Designação de Amostra	%LC	%HC	%NGHC	%Pureza	% de LMW Total	% de HMW Total
F16	32,1	56,7	0,8	88,9	8,3	2,8
F17	31,3	57,1	0,9	88,4	8,7	2,9
F18	31,3	55,1	0,8	86,4	11,0	2,6
F19	31,1	55,1	0,9	86,3	10,7	3,0
F20 rep 1	31,4	54,6	0,9	86,0	11,2	2,8
F20 rep 2	31,8	54,5	0,8	86,2	11,0	2,7
F20 rep 3	31,5	53,5	0,9	85,0	12,1	2,9
F21	31,8	60,1	0,8	91,8	5,7	2,5
F22	32,0	60,3	0,8	92,3	5,7	2,0
F23	31,9	60,2	0,8	92,1	5,4	2,5
F24	31,9	58,1	1,1	90,1	6,6	3,4
F25	31,7	61,3	1,2	92,9	4,0	3,1
F26	31,5	61,6	1,1	93,1	4,0	3,0
F27	31,4	61,7	1,1	93,1	4,0	2,9
F28	31,3	46,5	1,0	77,8	19,3	2,9
F29	31,2	37,3	0,9	68,5	29,1	2,4
F30	31,0	47,3	1,0	78,3	18,9	2,8

6.9 Eletroforese Capilar Não Reduzida – Dodecil sulfato de sódio

[00556] Os resultados para a eletroforese capilar não reduzida são mostrados na Tabela 29. Para as formulações com histidina a 5 ± 3°C, as

formulações F23 e F29 exibiram alta % de HMW de 3,6% e 3,3% comparadas com o resto das formulações com histidina. Para as formulações com histidina estressadas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, as formulações F28, F29 e F30 exibiram % de impurezas totais extremamente altas de 36,8%, 49,3% e 37,4%, respectivamente. Adicionalmente, as formulações F20 e F24 exibiram alta % de impurezas. Estas formulações não contiveram excipientes ou contiveram sacarose ou sorbitol. Com base nos dados, foi observado que a % de impurezas totais foram mais baixas em valores de pH mais altos para as amostras estressadas a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Para as formulações com histidina pH 5,0 a % de impurezas totais variou de 11,8 a 15,0%. Para as formulações com histidina no pH 5,5 (formulações F21, F22 e F23), a % de impurezas totais variou de 10,7 a 12,3% ao passo que a % de impurezas totais para as formulações com histidina no pH 6,0 (F25, F26 e F27) variou de 9,8 a 10,0%. Os resultados obtidos a partir dos dados de CE-SDS não reduzida confirmam que as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados mostrou melhor pureza comparadas com o resto das formulações com histidina.

Tabela 29. Resultados da Eletroforese Capilar Não Reduzida – Estudo DoE (F16 a F30)

5 ± 3°C

Amostra	% LMW	% Pico Principal	% HMW	% Impurezas Totais
F16	7,4	91,7	0,9	8,3
F17	7,7	91,7	0,6	8,3
F18	7,1	92,5	0,5	7,5
F19	6,9	92,7	0,4	7,3
F20-1	7,2	92,2	0,6	7,8
F20-2	7,1	92,4	0,5	7,6
F20-3	7,2	92,2	0,6	7,8
F21	7,0	92,4	0,6	7,6
F22	7,0	92,6	0,5	7,4
F23	6,5	89,9	3,6	10,1
F24	6,7	92,6	0,8	7,4
F25	6,7	92,6	0,7	7,4
F26	6,8	92,7	0,5	7,3
F27	6,8	92,7	0,5	7,3
F28	6,8	92,6	0,6	7,4
F29	7,2	89,5	3,3	10,5
F30	6,9	92,4	0,6	7,6

Tabela 29. (continuação) 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR

Amostra	% LMW	% Pico Principal	% HMW	% Impurezas Totais
F16	10,8	88,2	1,0	11,8
F17	11,5	87,2	1,3	12,8
F18	12,5	86,5	1,0	13,5
F19	11,6	85,0	3,4	15,0
F20-1	21,5	77,9	0,6	22,1
F20-2	21,7	77,7	0,6	22,3
F20-3	23,0	76,2	0,7	23,8
F21	11,0	87,7	1,3	12,3
F22	10,0	89,3	0,8	10,7
F23	9,9	89,1	0,9	10,9
F24	13,2	85,8	1,0	14,2
F25	8,9	90,0	1,1	10,0
F26	9,1	90,1	0,8	9,9
F27	8,9	90,2	0,8	9,8
F28	36,4	63,2	0,4	36,8
F29	48,8	50,7	0,5	49,3
F30	36,7	62,6	0,8	37,4

6.10 Dispersão de Luz Dinâmica

[00557] As formulações com acetato não estão sendo consideradas devido à mudança do pH observada nestas formulações. Com base nos dados de DLS para as formulações com histidina, as formulações F20-2, F24, F28 e F30 exibiram altos valores de %Pd a 5 ± 3°C (dados não mostrados). A formulação F29 teve designação multimodal para % de Pd indicando a presença de partículas proteináceas em solução. Os dados anteriores também indicaram que as formulações anteriormente mencionadas não tiveram condições ótimas. As formulações consistindo em sacarose e sorbitol exibiram alta %Pd em ambas as condições de temperatura. Isto também foi observado nos dados de DLS a partir do estudo de triagem de linha de base inicial. Para as formulações com histidina a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR, foi observado que no pH mais baixo, houve aumento na % de Pd. Para as formulações com histidina no pH 5,0, a % de Pd a 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR variaram de 4,7 a 18,2%. Para as formulações com histidina no pH 5,5 (F21, F22 e F23), a % de Pd variou de 7,9 a 9,5%. Finalmente, a % de Pd para as formulações com histidina no pH 6,0 (F25, F26 e F27) variou de 7,8 a 9,8%. As formulações com histidina no pH 5,5 (F21, F22 e F23) e 6,0 (F25, F26 e F27) exibiram os valores de % de Pd mais baixos comparados ao pH 5,0. Para

as formulações com histidina no pH 6,0, F25, F26 e F27 foram candidatas promissoras visto que todas as formulações demonstraram % de Pd baixa em ambas as condições de estresse e na presença de excipientes carregados.

7. Conclusões

[00558] Com base nos resultados obtidos do teste analítico do anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G nas várias formulações listadas na Tabela 17, a formulação F25 (30 mM de histidina, 150 mM de NaCl pH 6,0) foi a formulação ótima para esta molécula.

[00559] Os resultados da triagem biofísica da linha de base inicial sugeriram que as formulações com acetato e histidina no pH 5,5 na presença de NaCl e arginina foram condições ótimas de tampão/pH. Adicionalmente, arginina e NaCl foram uma escolha melhor de excipientes quando comparados ao sorbitol e sacarose. Os estudos de tensoativo e crioprotetor indicaram que nem PS-80 nem a sacarose foram requeridos para realçar a estabilidade da formulação. Para o estudo de estabilidade DoE, os resultados de DSC iniciais confirmaram que 30 mM das formulações com histidina no pH 6,0 tiveram valores de temperatura de fusão $T_{inicial}$ suficientemente altos. Mudanças significantes no pH foram observadas em todas as formulações de 30 mM de acetato. As formulações com histidina no pH 6,0 não exibiu nenhuma mudança significante no pH na estabilidade em quatro semanas a 5 ± 3°C e 40 ± 2°C/75 ± 5% de UR. Os dados de SEC demonstraram que a histidina pH 6,0 na presença de excipientes carregados conferiu a estabilidade máxima para este anticorpo. Os resultados de icIEF mostraram que as amostras de histidina pH 6,0 foram mais resistentes às mudanças na heterogeneidade de carga. Os mesmos também mostraram que as formulações na presença de sacarose e sorbitol exibiram a degradação máxima. Os resultados para a CE-SDS reduzida e não reduzida mostrou que as formulações com histidina no pH 6,0 na presença de excipientes carregados foram as melhores formulações. Os dados de DLS mostraram que as

formulações de histidina pH 5,5 e 6,0 na presença de excipientes carregados tiveram a mudança mínima na polidispersividade. No geral, a somatória dos dados disponíveis sustenta que 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio pH 6,0 como uma formulação para anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G.

Exemplo 56: Formulação de mistura de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G e anticorpo IgG1-hDR5-05-E430G

[00560] Uma mistura 1:1 de anticorpo IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (20 mg/mL) e IgG1-hDR5-05-E430G (20 mg/mL), ambos formulados em 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio pH 6,0 foi armazenada a 5º de modo a investigar a estabilidade da mistura na respectiva formulação. As amostras foram analisadas depois de 2, 4, 8 e 12 semanas assim como depois de 6 meses de armazenagem, pela aparência, pH, conteúdo de proteína, Cromatografia por exclusão de tamanho, Eletroforese capilar reduzida e não reduzida – Dodecil sulfato de sódio e Focalização Isoelétrica Capilar com Imageamento, usando os métodos descritos no Exemplo 54.

Resultados

[00561] Nenhuma mudança significante foi observada em qualquer uma das propriedades testadas. Assim, a mistura de anticorpo foi estável durante pelo menos 6 meses na temperatura de armazenagem de 5°C.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende

a. um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina G humana e uma região de ligação a antígeno, em que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a E430, E345 ou S440 na IgG1 humana, numeração EU,

b. um tampão de histidina, e

c. cloreto de sódio

em que o pH da composição está entre 5,5 e 7,4.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição compreende de 5 mM a 100 mM de histidina, por exemplo de 5 mM a 75 mM, tal como de 10 mM a 50 mM, por exemplo de 15 mM a 45 mM, tal como de 20 mM a 40 mM, por exemplo de 25 a 35 mM, tal como de 28 mM a 32 mM, por exemplo 30 mM de histidina.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o pH é de 5,8 a 7,2, tal como 5,5 a 6,5, por exemplo 5,8 a 6,2, por exemplo 5,9 a 6,1, tal como 6,0.

4. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende de 25 mM a 500 mM de cloreto de sódio, por exemplo de 25 mM a 250 mM, tal como de 50 mM a 250 mM, por exemplo de 100 mM a 200 mM, tal como de 125 mM a 175 mM, por exemplo 150 mM de cloreto de sódio.

5. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a concentração de anticorpo é de 0,5 mg/ml a 250 mg/ml, tal como de 1 mg/ml a 100 mg/ml, por exemplo de 1 mg/ml a 50 mg/ml, tal como de 2 mg/ml a 20 mg/ml, tal como

de 15 mg/ml a 25 mg/ml, tal como de 18 mg/ml a 23 mg/ml, tal como de 19 mg/ml a 21 mg/ml, tal como de 18 mg/ml a 20 mg/ml, tal como de 5 mg/ml a 15 mg/ml, tal como 10 mg/ml ou tal como 20 mg/ml.

6. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende de 10 mM a 50 mM de histidina, de 50 mM a 250 mM de cloreto de sódio e de 2 mg/ml a 20 mg/ml de anticorpo em um pH entre 5,5 e 6,5, preferivelmente em que a composição compreende 30 mM de histidina, 150 mM de cloreto de sódio e 20 mg/ml de anticorpo no pH 6,0.

7. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição não compreende um tensoativo.

8. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição não compreende um crioprotetor.

9. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região Fc compreende uma mutação de um aminoácido em uma posição correspondendo a S440 na IgG1 humana, numeração EU, com a condição de que a mutação em S440 é S440Y ou S440W.

10. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região Fc compreende uma mutação selecionada do grupo consistindo de: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y.

11. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região Fc compreende uma mutação selecionada de E430G ou E345K.

12. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região Fc

compreende uma mutação E430G.

13. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região Fc compreende ainda uma mutação selecionada de K439E ou S440K.

14. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região de ligação a antígeno se liga ao DR5 humano.

15. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região de ligação a antígeno se liga a um epítopo no DR5 humano compreendendo ou requerendo um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 116 a 138 e um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 139 a 166 da SEQ ID NO: 46.

16. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região de ligação a antígeno se liga a um epítopo no DR5 humano compreendendo ou requerendo um ou mais resíduos de aminoácido localizados dentro dos resíduos de aminoácido 79 a 138 da SEQ ID NO: 46.

17. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região de ligação a antígeno compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve (VL) compreendendo os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

b) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

c) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14;

d) (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ ID NOs: 21,

GAS, 22 ou

e) a CDR1, CDR2, CDR3 (VH) e CDR1, CDR2 e CDR3 (VL) como definidas em qualquer um de a) a d) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR.

18. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região de ligação a antígeno compreende uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL) tendo as sequências de aminoácido de:

a) (VH) SEQ ID NO: 4 e (VL) SEQ ID NO: 7;

b) (VH) SEQ ID NO: 9 e (VL) SEQ ID NO: 7;

c) (VH) SEQ ID NO: 12 e (VL) SEQ ID NO: 15;

d) (VH) SEQ ID NO: 19 e (VL) SEQ ID NO: 23;

e) (VH) SEQ ID NO: 20 e (VL) SEQ ID NO: 23 ou

f) a (VH) e (VL) como definidas em qualquer um de a) a e) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas sequências (VH) e (VL).

19. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é uma IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

20. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um isótipo IgG1.

21. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um alótipo IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(z), IgG1m(x) ou alótipo misto.

22. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região Fc compreende uma sequência de aminoácido do seguinte grupo:

a) SEQ ID NO: 29;

b) SEQ ID NO: 30;

c) SEQ ID NO: 31;

d) SEQ ID NO: 32 ou

e) uma sequência de aminoácido como definida em qualquer um de a) a d) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através da dita sequência.

23. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 39 e em que a HC compreende uma das seguintes sequências:

a) (HC) SEQ ID NO: 33;

b) (HC) SEQ ID NO: 34;

c) (HC) SEQ ID NO: 35;

d) (HC) SEQ ID NO: 36;

e) (HC) SEQ ID NO: 37;

f) (HC) SEQ ID NO: 38; ou

g) a (HC) como definida em qualquer um de a) a f) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através da dita sequência (HC).

24. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a LC compreende a sequência da SEQ ID NO: 43 e em que a HC compreende uma das seguintes sequências:

a) (HC) SEQ ID NO: 40;

b) (HC) SEQ ID NO: 41;

c) (HC) SEQ ID NO: 42; ou

d) a (HC) como definida em qualquer um de a) a c) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através da dita sequência (HC).

25. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

26. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo biespecífico compreendendo uma ou mais regiões de ligação a antígeno como definidas em qualquer uma das reivindicações 14 a 18.

27. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é humano, humanizado ou quimérico.

28. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é agonístico.

29. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo induz a morte celular programada em uma célula alvo, tal como a morte celular dependente de caspase.

30. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo induz apoptose em uma célula alvo expressando DR5.

31. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o anticorpo reduz a viabilidade celular.

32. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que compreende dois ou mais anticorpos.

33. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 31 e um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 31.

34. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região Fc e o segundo anticorpo compreende uma segunda região Fc.

35. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar ao DR5 e uma primeira região Fc e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar ao DR5 e uma segunda região Fc.

36. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo se ligam a epítopos diferentes no DR5 humano.

37. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 36, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo a se ligar ao DR5 humano não bloqueia a ligação do dito segundo anticorpo ao DR5 humano.

38. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, ou em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem,

c) as seis sequências da CDR definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

39. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 e (VL) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, ou em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem,

c) as seis sequências da CDR definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

40. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

a) (VH) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 e (VL) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6 e o dito segundo anticorpo compreende as seguintes seis sequências da CDR,

b) (VH) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 e (VL) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, ou em que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo compreendem,

c) as seis sequências da CDR definidas em (a) ou (b) acima tendo uma a cinco mutações ou substituições no total através das ditas seis sequências da CDR respectivamente.

41. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 40, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma

razão molar de 1:49 a 49:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:1, uma razão molar de cerca de 1:2, uma razão molar de cerca de 1:3, uma razão molar de cerca de 1:4, uma razão molar de cerca de 1:5, uma razão molar de cerca de 1:6, uma razão molar de cerca de 1:7, uma razão molar de cerca de 1:8, uma razão molar de cerca de 1:9, uma razão molar de cerca de 1:10, uma razão molar de cerca de 1:15, uma razão molar de cerca de 1:20, uma razão molar de cerca de 1:25, uma razão molar de cerca de 1:30, uma razão molar de cerca de 1:35, uma razão molar de cerca de 1:40, uma razão molar de cerca de 1:45, uma razão molar de cerca de 1:49, uma razão molar de cerca de 49:1, uma razão molar de cerca de 45:1, uma razão molar de cerca de 40:1, uma razão molar de cerca de 35:1, uma razão molar de cerca de 30:1, uma razão molar de cerca de 25:1, uma razão molar de cerca de 20:1, uma razão molar de cerca de 15:1, uma razão molar de cerca de 10:1, uma razão molar de cerca de 9:1, uma razão molar de cerca de 8:1, uma razão molar de cerca de 7:1, uma razão molar de cerca de 6:1, uma razão molar de cerca de 5:1, uma razão molar de cerca de 4:1, uma razão molar de cerca de 3:1, uma razão molar de cerca de 2:1.

42. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 41, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de cerca de 1:9 a 9:1.

43. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 42, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro anticorpo e o dito segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de cerca de 1:1.

44. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de ser para o uso como um medicamento.

45. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma

das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5, para o uso no tratamento de doença infecciosa, doença autoimune ou anomalias cardiovasculares.

46. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5 para o uso no tratamento de tumores sólidos e/ou tumores hematológicos.

47. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5, para o uso no tratamento de tumores sólidos tais como, câncer colorretal, incluindo carcinoma colorretal e adenocarcinoma colorretal, câncer de bexiga, osteossarcoma, condrossarcoma, câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo-negativo, cânceres do sistema nervoso central, incluindo glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, fibrossarcoma neural, tumores neuroendócrino, câncer cervical, câncer do endométrio, câncer gástrico, incluindo adenocarcinoma gástrico, câncer da cabeça e pescoço, câncer renal, câncer hepático, incluindo carcinoma hepatocelular, câncer pulmonar, incluindo NSCLC e SCLC, câncer ovariano, câncer pancreático, incluindo carcinoma dutal pancreático e adenocarcinoma pancreático, sarcoma ou câncer de pele, incluindo melanoma maligno e cânceres de pele não melanoma.

48. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5, para o uso no tratamento de tumores hematológicos tais como, leucemia, incluindo leucemia linfocítica crônica e leucemia mielóide, incluindo leucemia mielóide aguda e leucemia mielóide crônica, linfoma, incluindo Linfoma Não Hodgkin ou mieloma múltiplo, incluindo Linfoma de Hodgkin ou incluindo síndromes mielodisplásticas.

49. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5, para o uso na inibição do crescimento de tumores expressando DR5.

50. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5, para o uso na indução de apoptose em tumores expressando DR5.

51. Uso da composição farmacêutica compreendendo um ou mais anticorpos anti-DR5 como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer.

52. Método para tratar um indivíduo tendo um câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a composição compreende um ou mais anticorpos anti-DR5.

53. Método de acordo com a reivindicação 52 caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um agente terapêutico adicional.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um ou mais agentes anticâncer selecionados do grupo consistindo de produtos quimioterapêuticos (incluindo mas não limitado a paclitaxel, temozolomida, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, irinotecano, doxorrubicina, gencitabina, 5-fluorouracila, pemetrexed), inibidores de cinase (incluindo mas não limitado a sorafenib, sunitinib ou everolimus), agentes moduladores de apoptose (incluindo mas não limitado a TRAIL humano recombinante ou birinapant), inibidores de RAS, inibidores de proteassoma (incluindo mas não limitado a

bortezomib), inibidores da histona desacetilase (incluindo mas não limitado a vorinostat), nutracêuticos, citocinas (incluindo mas não limitado a IFN-γ), anticorpos ou miméticos de anticorpo (incluindo mas não limitados aos anticorpos e miméticos de anticorpo anti-EGFR, anti-IGF-1R, anti-VEGF, anti-CD20, anti-CD38, anti-HER2, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-CD40, anti-CD137, anti-GITR), conjugados de anticorpo-fármaco.

55. Kit de partes, caracterizado pelo fato de que compreende duas ou mais composições farmacêuticas como definidas em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as composições são para uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia.

56. Kit de partes de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que as composições são para uso simultâneo em terapia, em que as composições são misturadas imediatamente antes do uso.

57. Método para preparar uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 33 a 43, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende misturar uma primeira composição farmacêutica compreendendo um primeiro anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31 com uma segunda composição farmacêutica compreendendo um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 31.

Figura 1

```
                                                
```

Figura 2

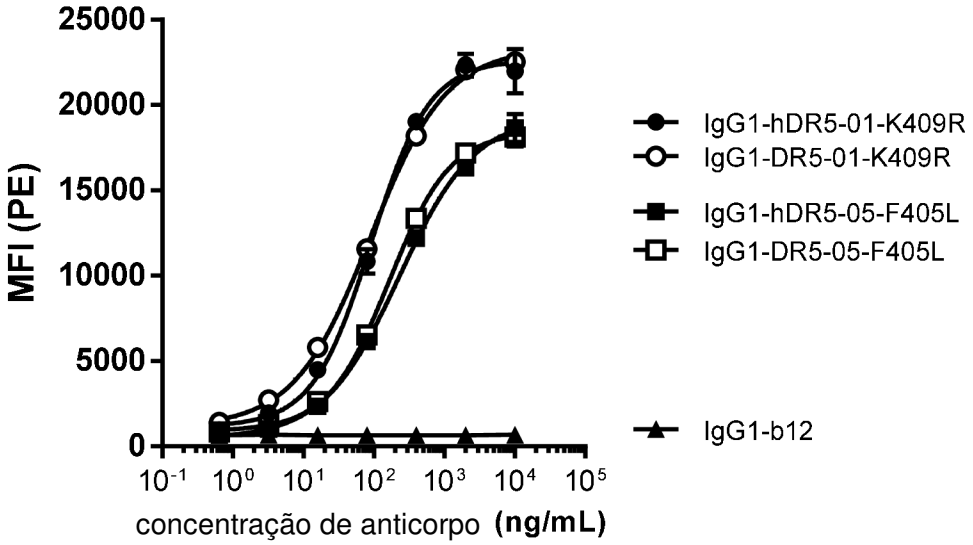

25000
20000
15000
10000
5000
0
MFI (PE)
10-1 10⁰ 10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵
concentração de anticorpo (ng/mL)
IgG1-hDR5-01-K409R
IgG1-DR5-01-K409R
IgG1-hDR5-05-F405L
IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-b12

Figura 3

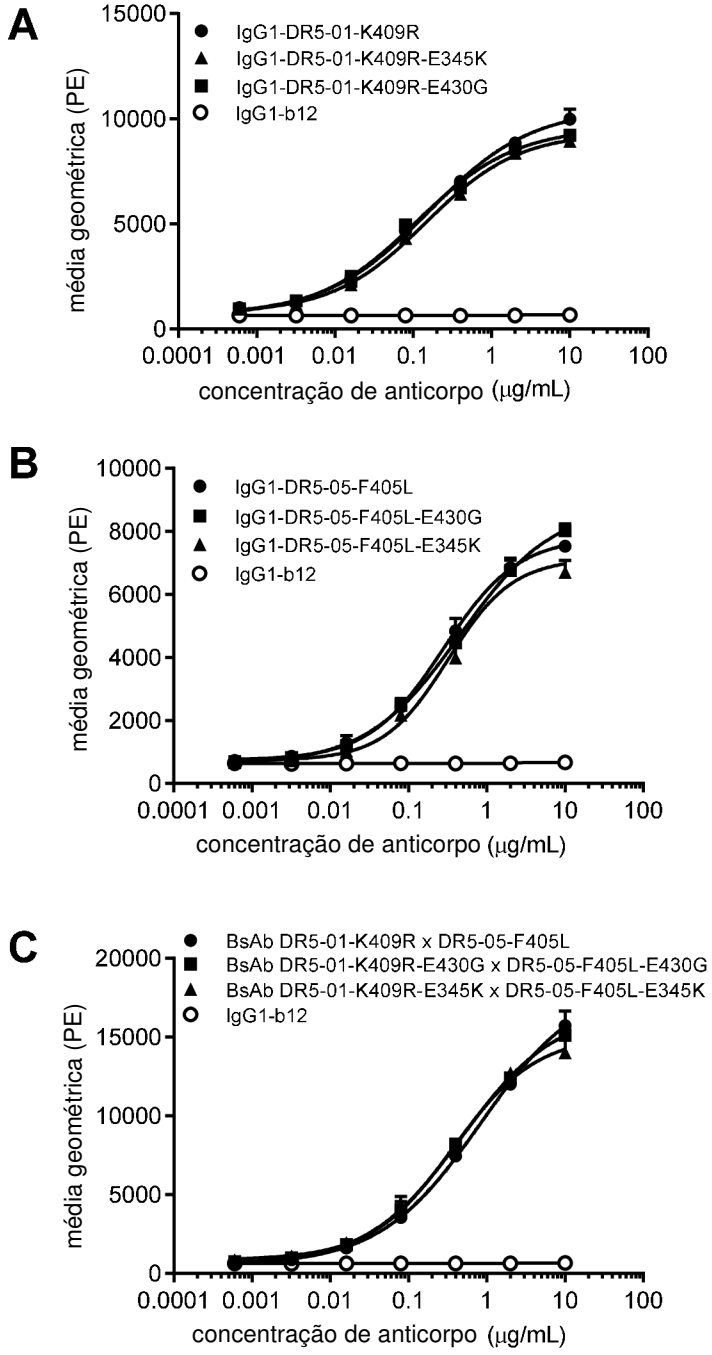

A
15000
10000
5000
0
média geométrica (PE)
IgG1-DR5-01-K409R
IgG1-DR5-01-K409R-E345K
IgG1-DR5-01-K409R-E430G
IgG1-b12
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
concentração de anticorpo (μg/mL)
B
10000
8000
6000
4000
2000
0
média geométrica (PE)
IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-05-F405L-E345K
IgG1-b12
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
concentração de anticorpo (μg/mL)
C
20000
15000
10000
5000
0
média geométrica (PE)
BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L
BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G
BsAb DR5-01-K409R-E345K x DR5-05-F405L-E345K
IgG1-b12
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
concentração de anticorpo (μg/mL)

Figura 4

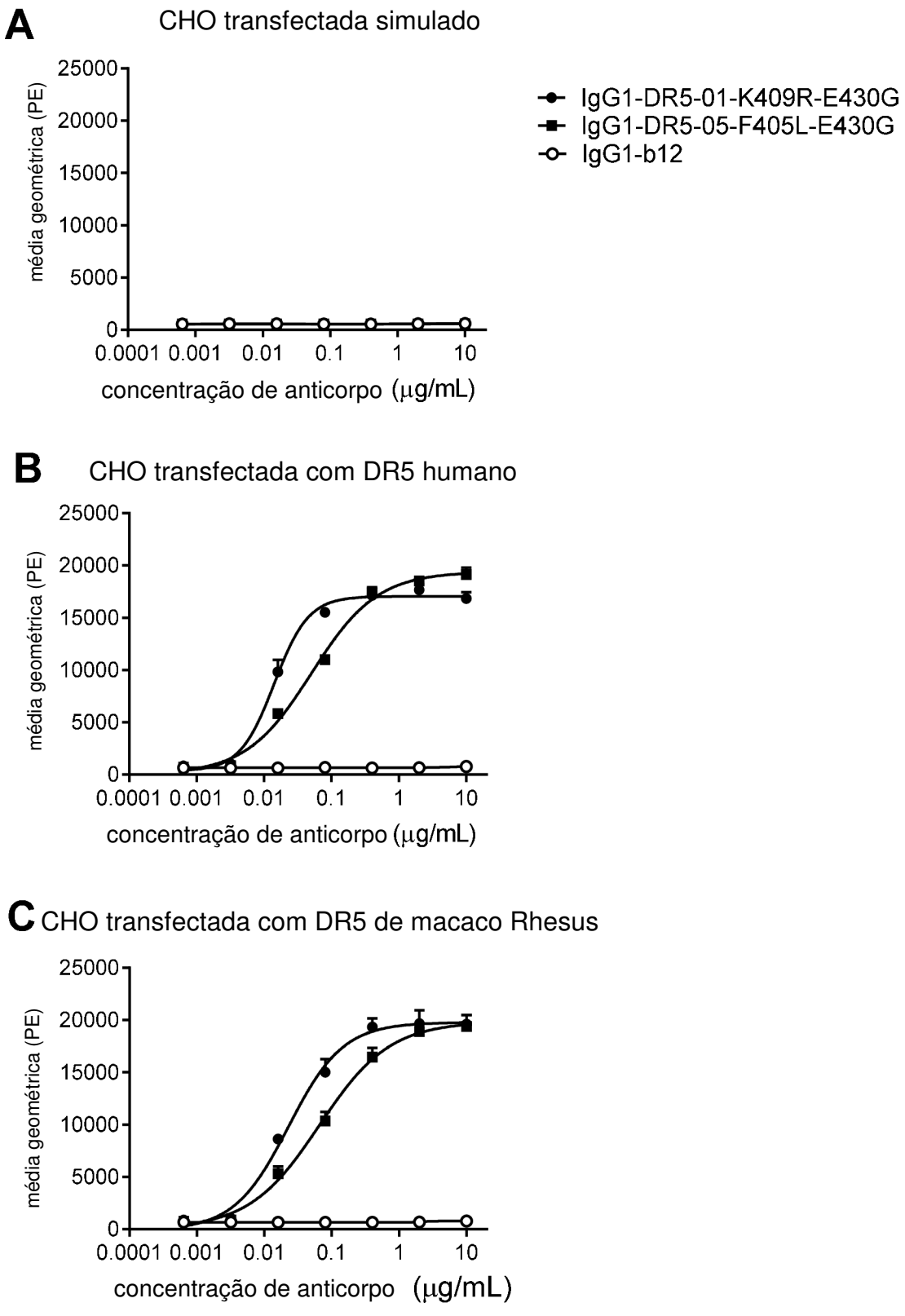

A
CHO transfectada simulado
média geométrica (PE)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10
concentração de anticorpo (μg/mL)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G
IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-b12
B
CHO transfectada com DR5 humano
média geométrica (PE)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10
concentração de anticorpo (μg/mL)
C
CHO transfectada com DR5 de macaco Rhesus
média geométrica (PE)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10
concentração de anticorpo (μg/mL)

Figura 5

A

```
H.s. --ITQQDLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYGQDY
              :  . :  :.   ::: : :  : ..::   .:  :. : ::
M.m. NP------AHNRPAGLQRPEESPSRGPCLAGQYLSEG--NCKPCREGIDY

H.s. STHWNDLL-FCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEM
     ..: :  :  :. :: :   .:  . :  : ::::.:. ::: ..:::::.
M.m. TSHSNHSLDSCILCTVCKEDKVVETRCNITTNTVCRCKPGTFEDKDSPEI

H.s. CRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVHK
     :. : . :  :  ..  :::  . .:: :
M.m. CQSC-SNCTDGEEELTSCTPRENRKCVSK
```

B

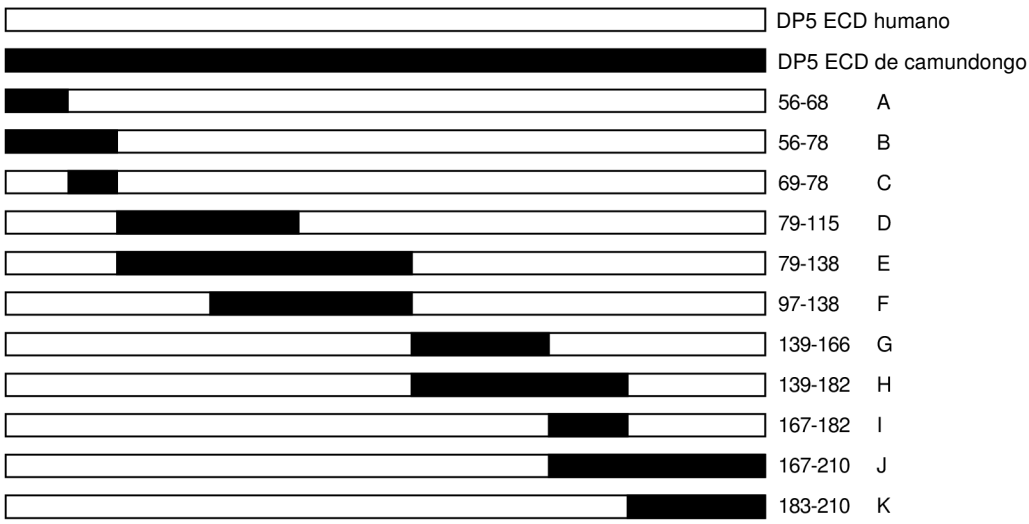
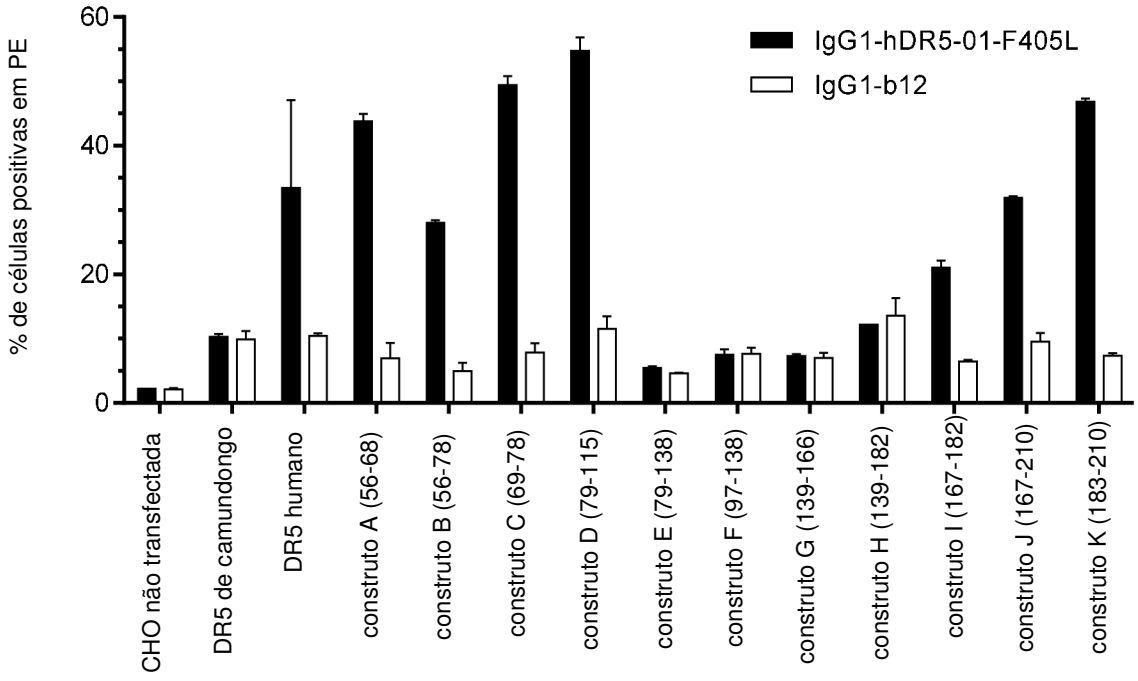


Figura 5 (continuação)

C



D

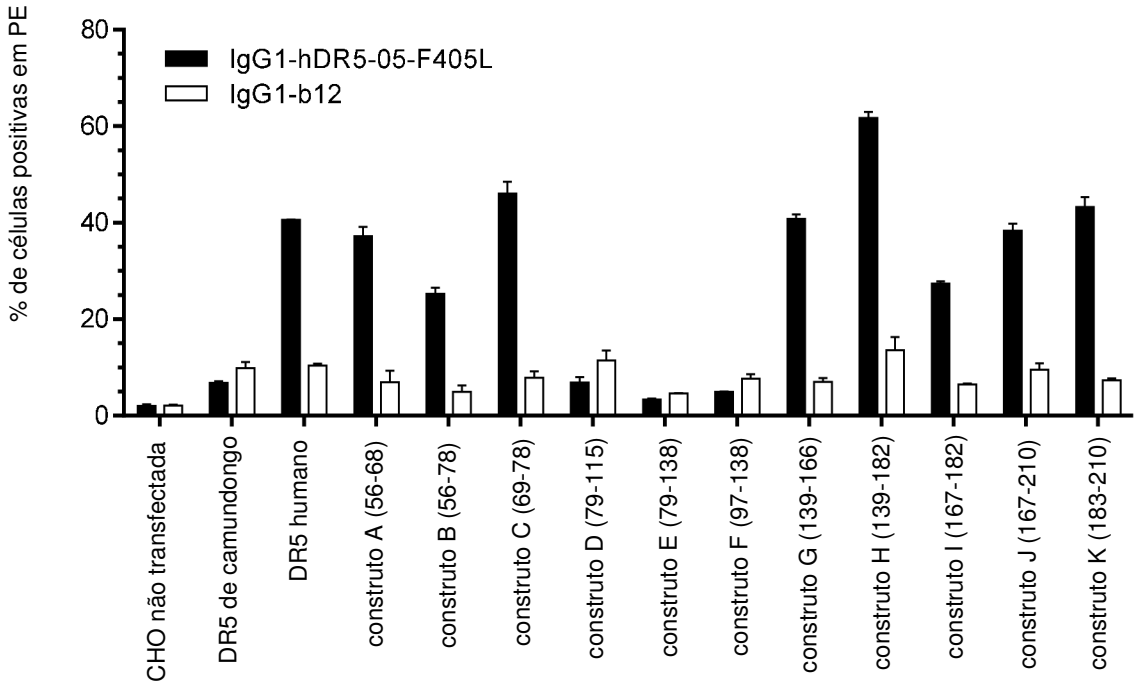


Figura 6

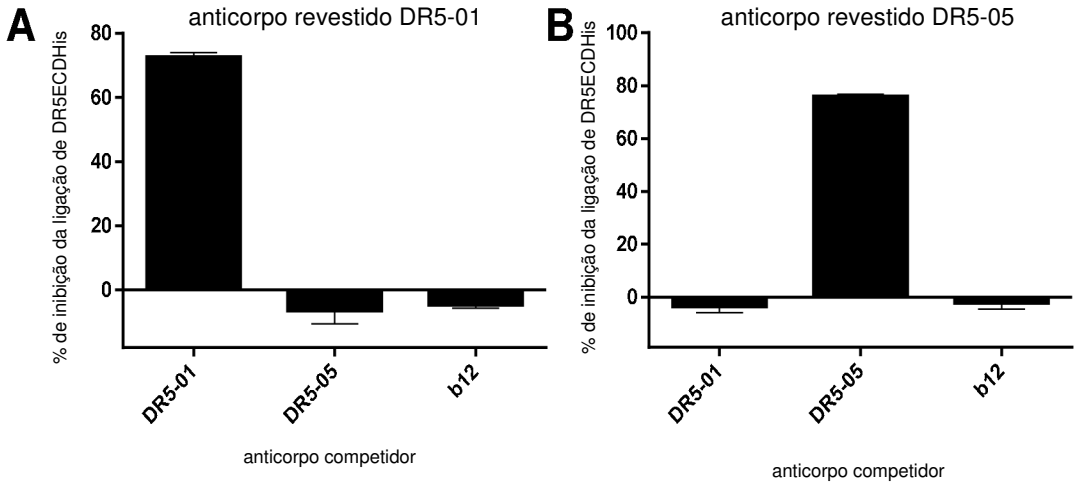
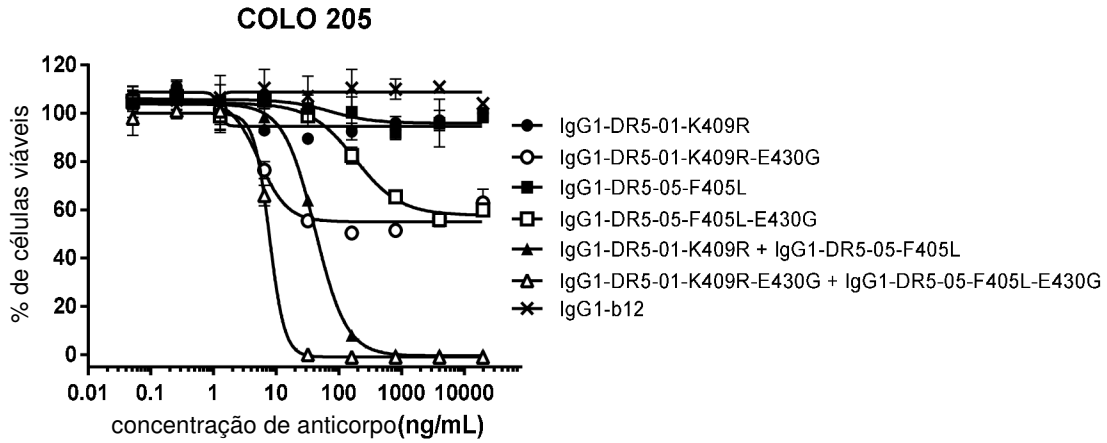

A
anticorpo revestido DR5-01
% de inibição da ligação de DR5ECDHis
80
60
40
20
0
DR5-01
DR5-05
b12
anticorpo competidor
B
anticorpo revestido DR5-05
% de inibição da ligação de DR5ECDHis
100
80
60
40
20
0
DR5-01
DR5-05
b12
anticorpo competidor

Figura 7

A


COLO 205
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentração de anticorpo(ng/mL)
IgG1-DR5-01-K409R
IgG1-DR5-01-K409R-E430G
IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-b12

B

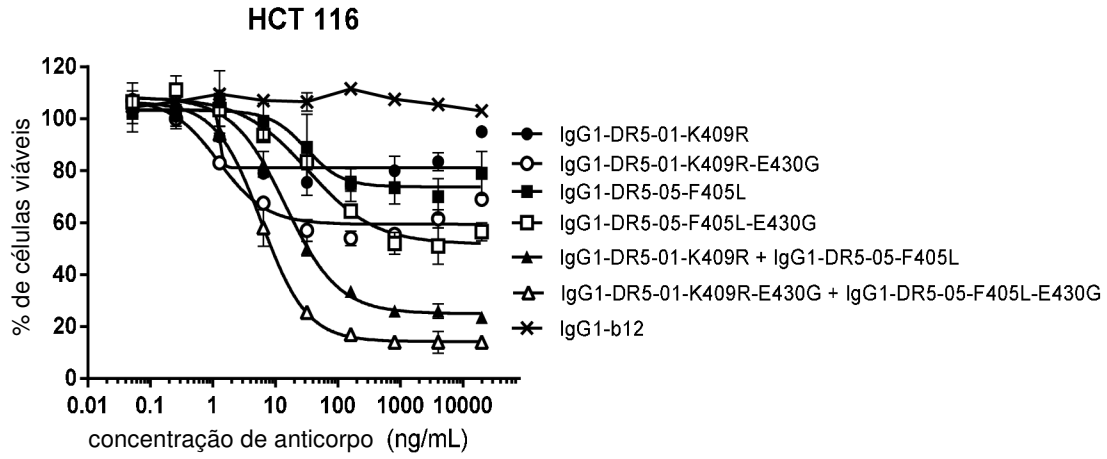

HCT 116
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
concentração de anticorpo (ng/mL)
IgG1-DR5-01-K409R
IgG1-DR5-01-K409R-E430G
IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-b12

Figura 8

A

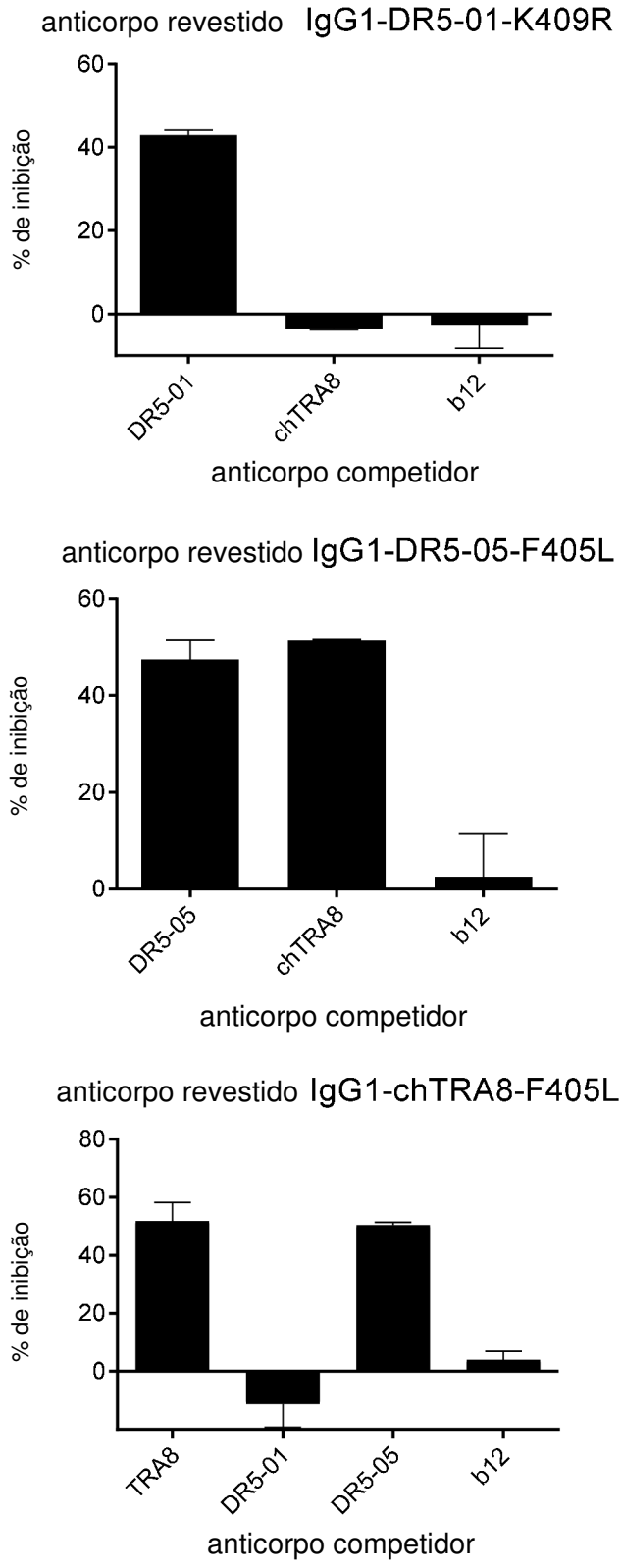
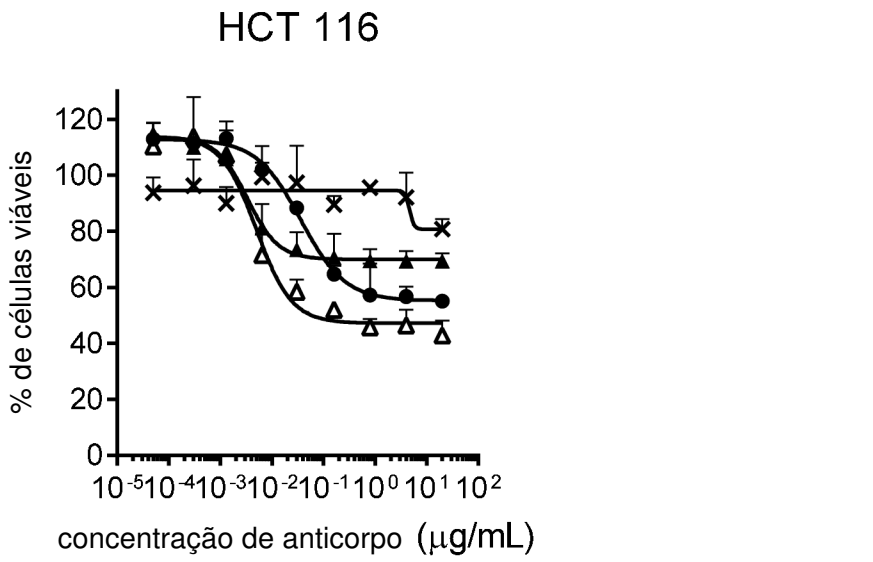

anticorpo revestido IgG1-DR5-01-K409R
% de inibição
60
40
20
0
DR5-01
chTRA8
b12
anticorpo competidor
anticorpo revestido IgG1-DR5-05-F405L
% de inibição
60
40
20
0
DR5-05
chTRA8
b12
anticorpo competidor
anticorpo revestido IgG1-chTRA8-F405L
% de inibição
80
60
40
20
0
TRA8
DR5-01
DR5-05
b12
anticorpo competidor

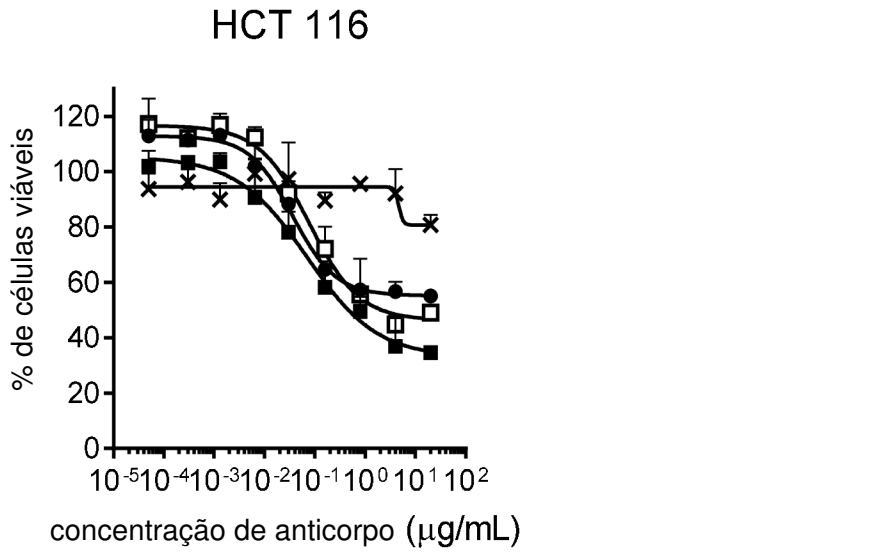
Figura 8 continuação

B



× IgG1-b12
● IgG1-chTRA8-F405L-E430G
▲ IgG1-DR5-01-K409R-E430G
△ IgG1-chTRA8-F405L-E430G + IgG1-DR5-01-K409R-E430G

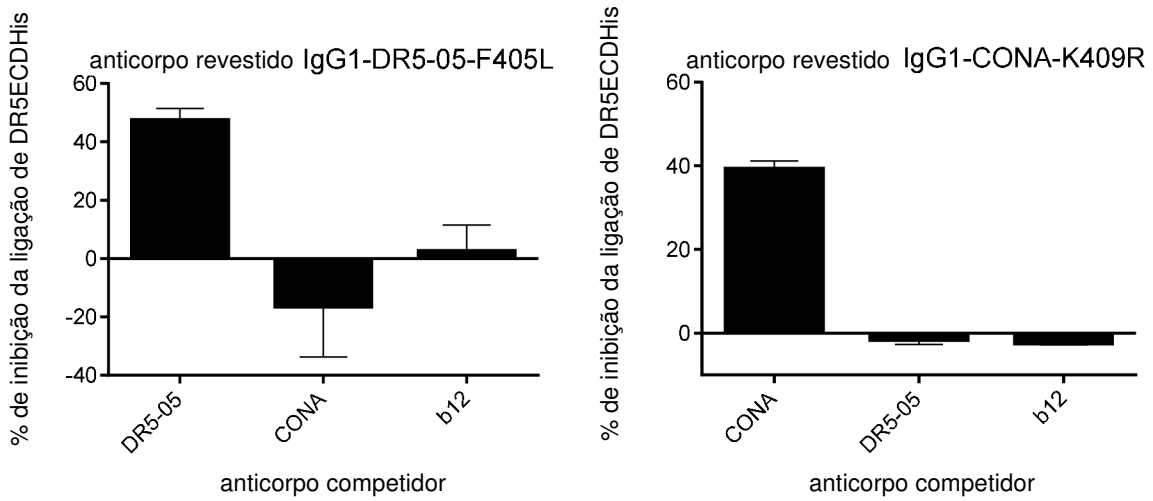
C



× IgG1-b12
● IgG1-chTRA8-F405L-E430G
■ IgG1-DR5-05-F405L-E430G
□ IgG1-chTRA8-F405L-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G

Figura 9

A


anticorpo revestido IgG1-DR5-05-F405L
% de inibição da ligação de DR5ECDHis
60
40
20
0
-20
-40
DR5-05
CONA
b12
anticorpo competidor
anticorpo revestido IgG1-CONA-K409R
% de inibição da ligação de DR5ECDHis
60
40
20
0
CONA
DR5-05
b12
anticorpo competidor

B

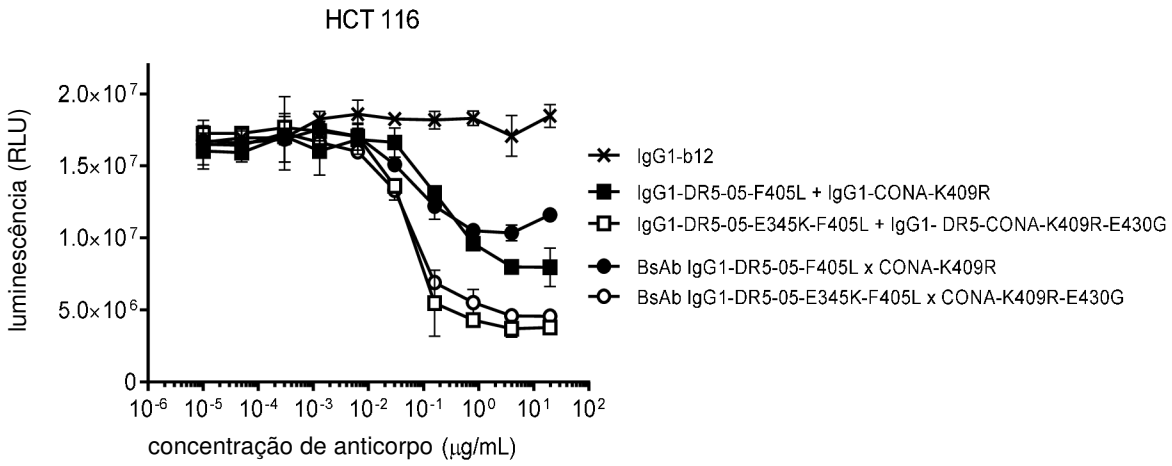

HCT 116
luminescência (RLU)
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
10^-6 10^-5 10^-4 10^-3 10^-2 10^-1 10^0 10^1 10^2
concentração de anticorpo (μg/mL)
IgG1-b12
IgG1-DR5-05-F405L + IgG1-CONA-K409R
IgG1-DR5-05-E345K-F405L + IgG1- DR5-CONA-K409R-E430G
BsAb IgG1-DR5-05-F405L x CONA-K409R
BsAb IgG1-DR5-05-E345K-F405L x CONA-K409R-E430G

Figura 10

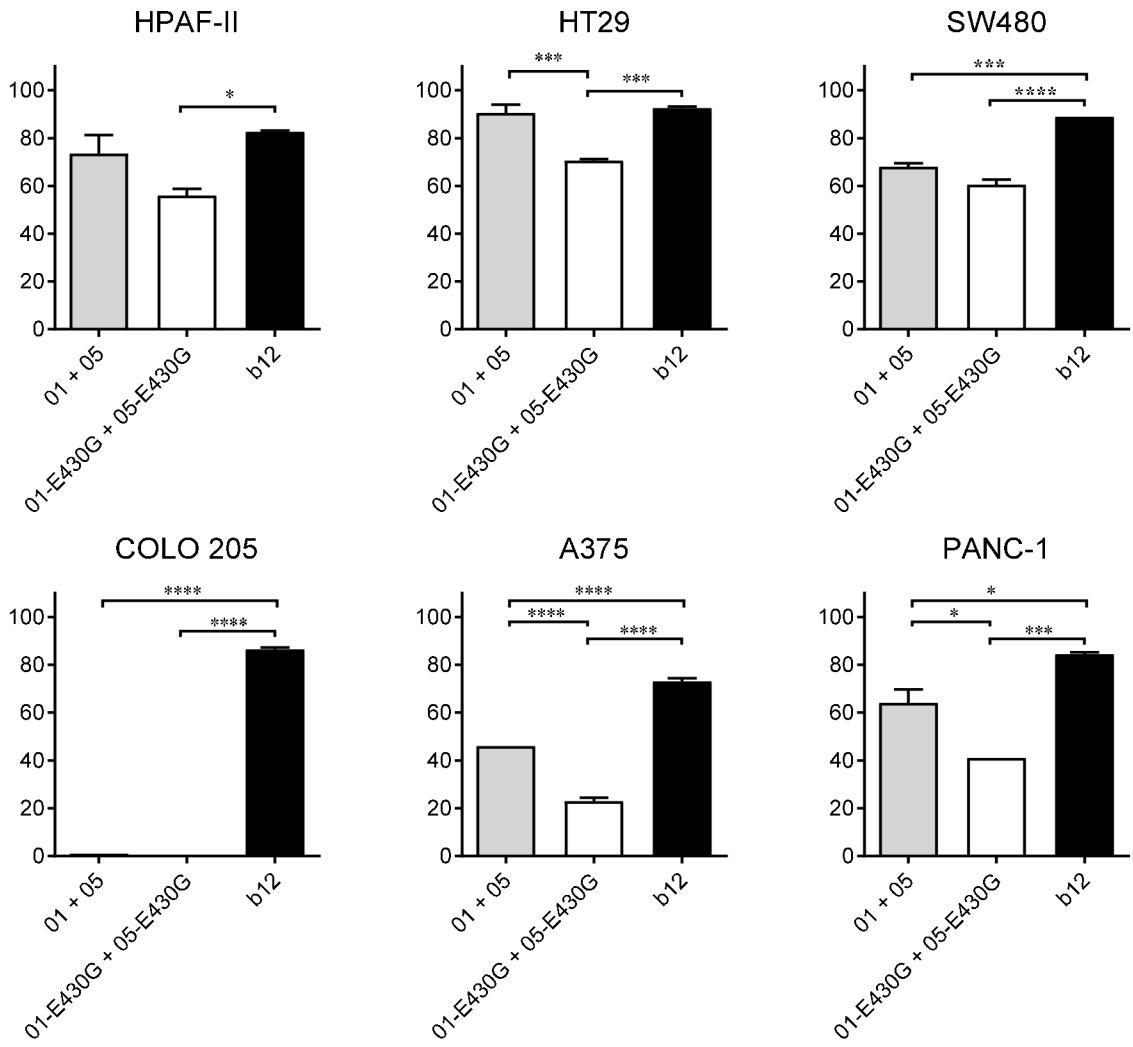

HPAF-II
HT29
SW480
COLO 205
A375
PANC-1
01 + 05
01-E430G + 05-E430G
b12

Figura 10 continuação

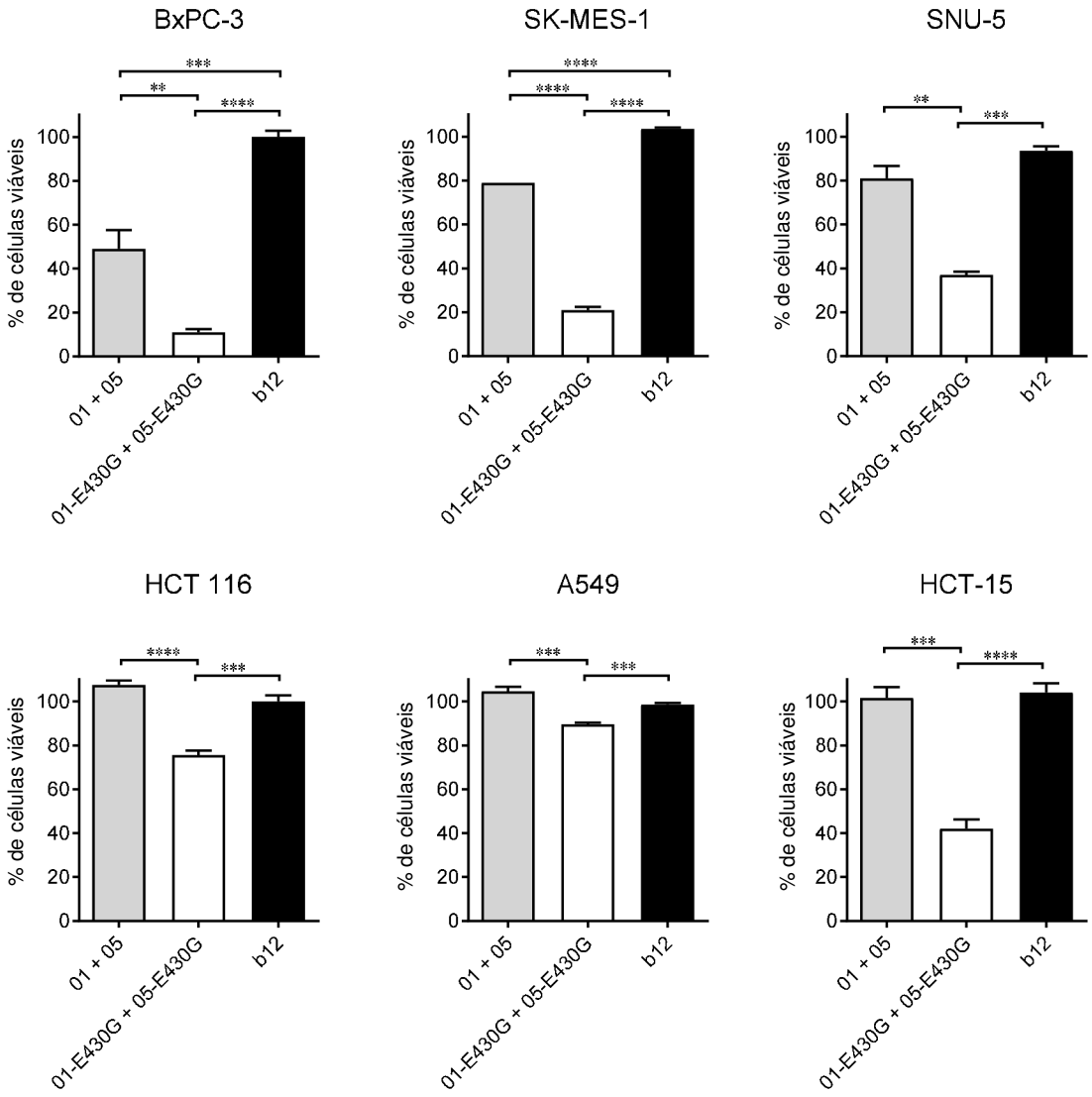


Figura 11

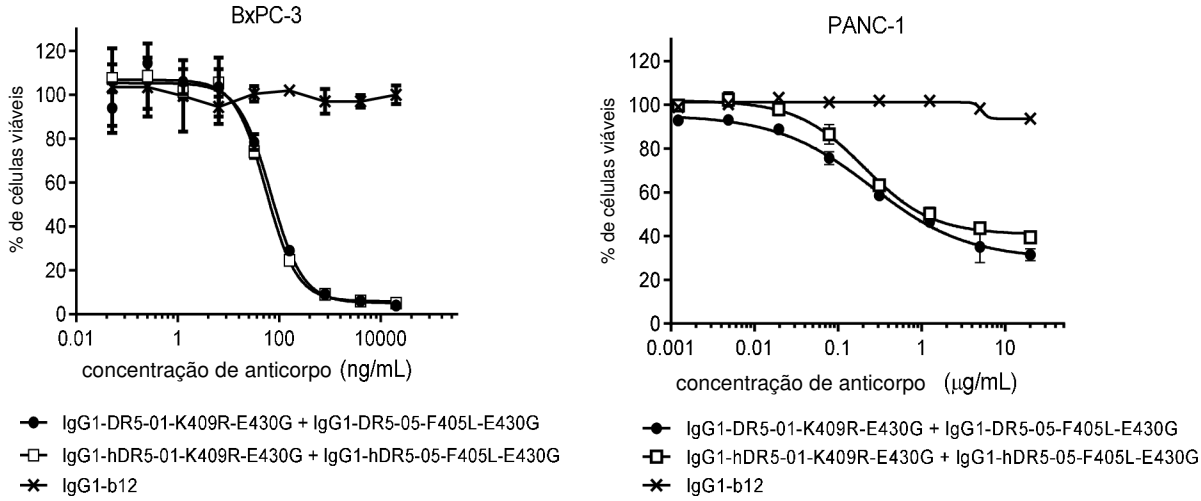
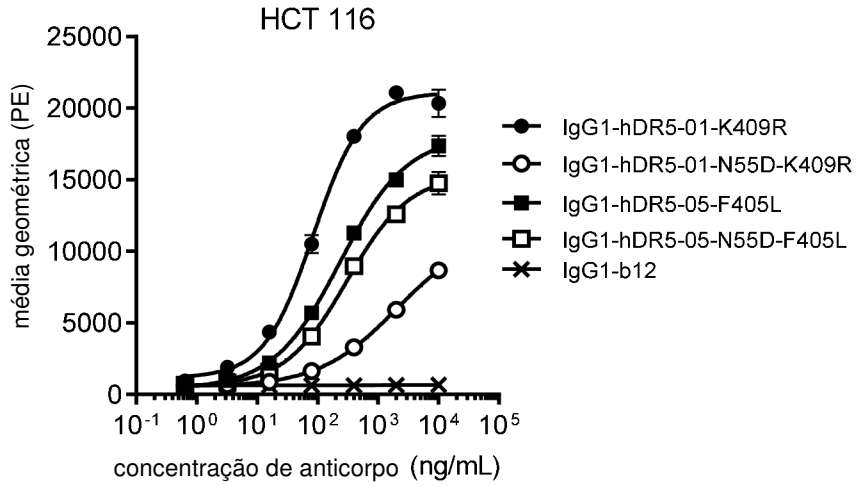

BxPC-3
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1
100
10000
concentração de anticorpo (ng/mL)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G
IgG1-b12
PANC-1
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
concentração de anticorpo (μg/mL)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G
IgG1-b12

Figura 12

A


HCT 116
média geométrica (PE)
25000
20000
15000
10000
5000
0
10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4} 10^{5}
concentração de anticorpo (ng/mL)
IgG1-hDR5-01-K409R
IgG1-hDR5-01-N55D-K409R
IgG1-hDR5-05-F405L
IgG1-hDR5-05-N55D-F405L
IgG1-b12

B

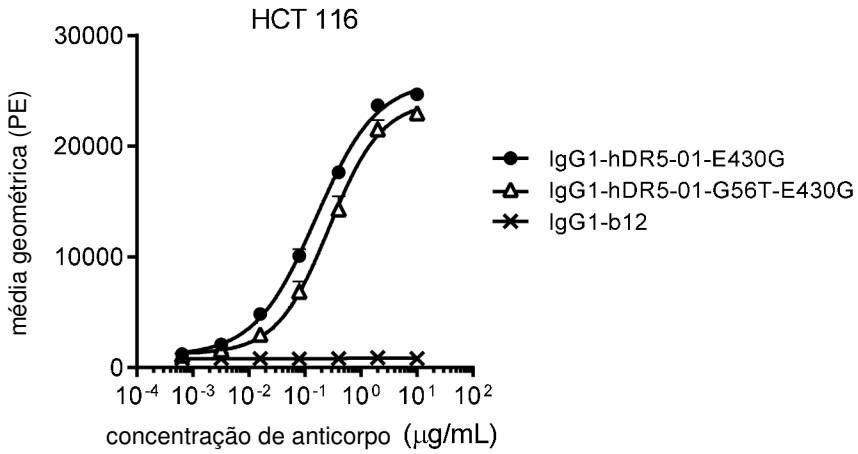

HCT 116
média geométrica (PE)
30000
20000
10000
0
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
concentração de anticorpo (μg/mL)
IgG1-hDR5-01-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-b12

Figura 12 (continuação)

C

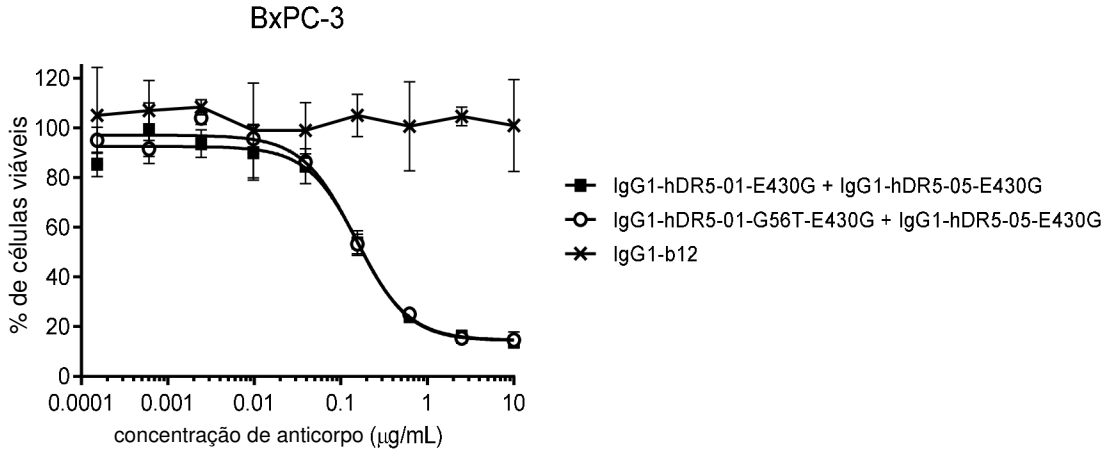


Figura 13

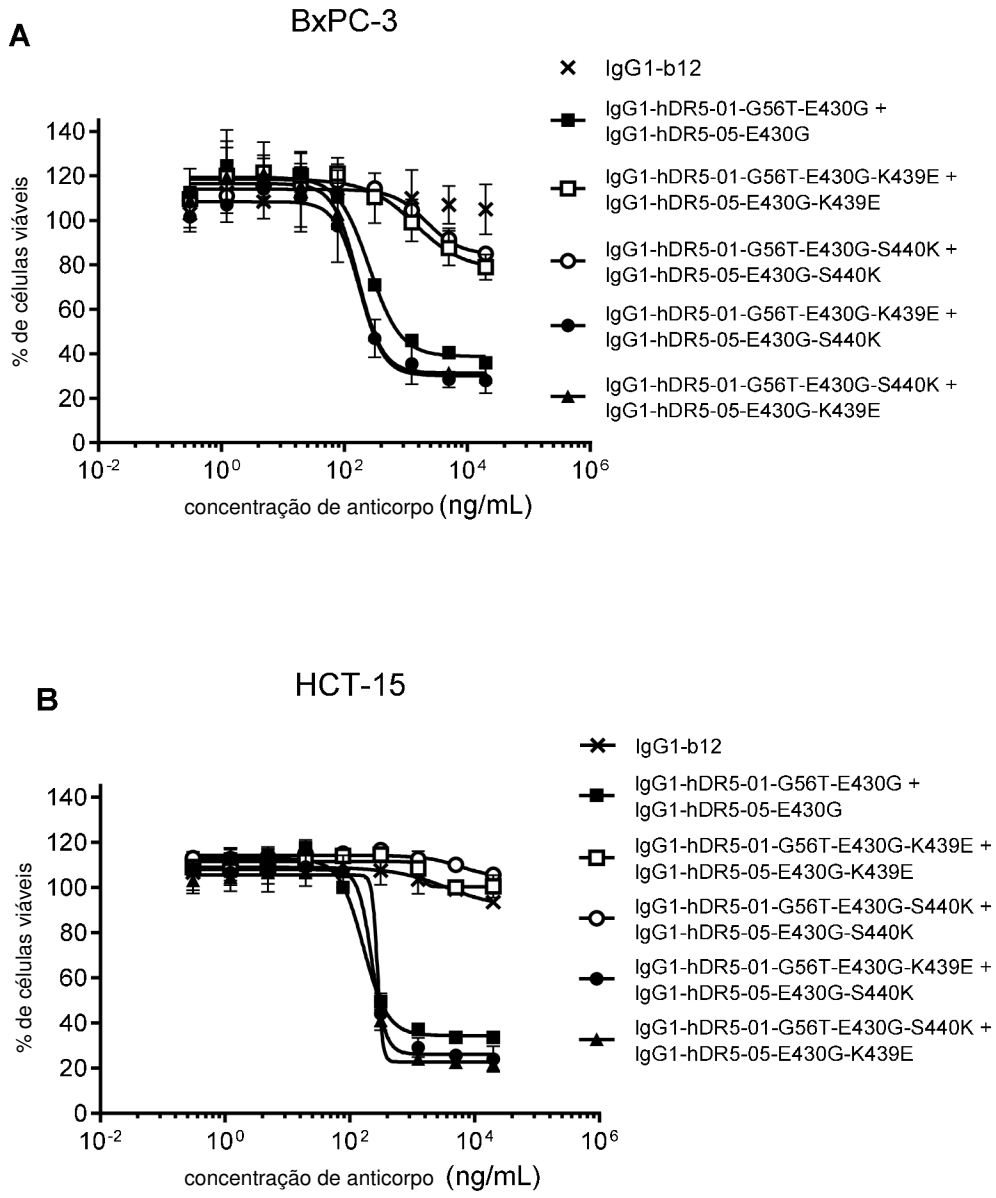

A
BxPC-3
% de células viáveis
concentração de anticorpo (ng/mL)
IgG1-b12
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-E430G-K439E
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-S440K + IgG1-hDR5-05-E430G-S440K
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-E430G-S440K
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-S440K + IgG1-hDR5-05-E430G-K439E
B
HCT-15
% de células viáveis
concentração de anticorpo (ng/mL)
IgG1-b12
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-E430G-K439E
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-S440K + IgG1-hDR5-05-E430G-S440K
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-E430G-S440K
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G-S440K + IgG1-hDR5-05-E430G-K439E

Figura 14

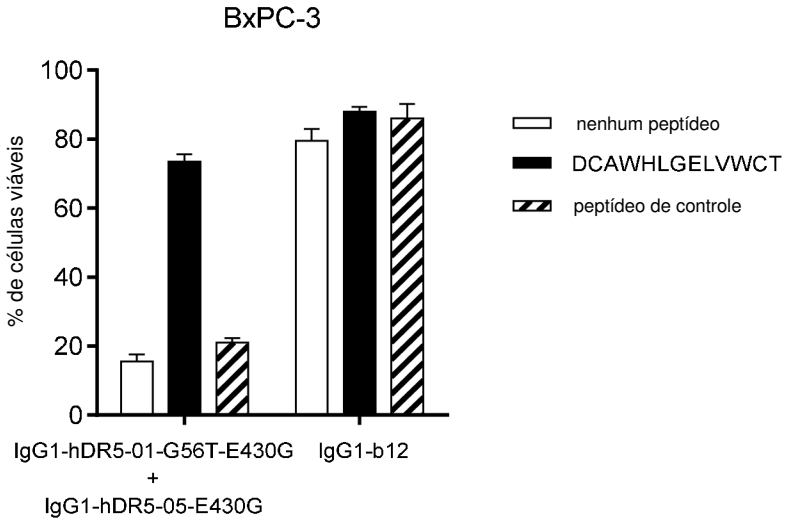

BxPC-3
100
80
60
40
20
0
% de células viáveis
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
+
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-b12
nenhum peptídeo
DCAWHLGELVWCT
peptídeo de controle

Figura 15

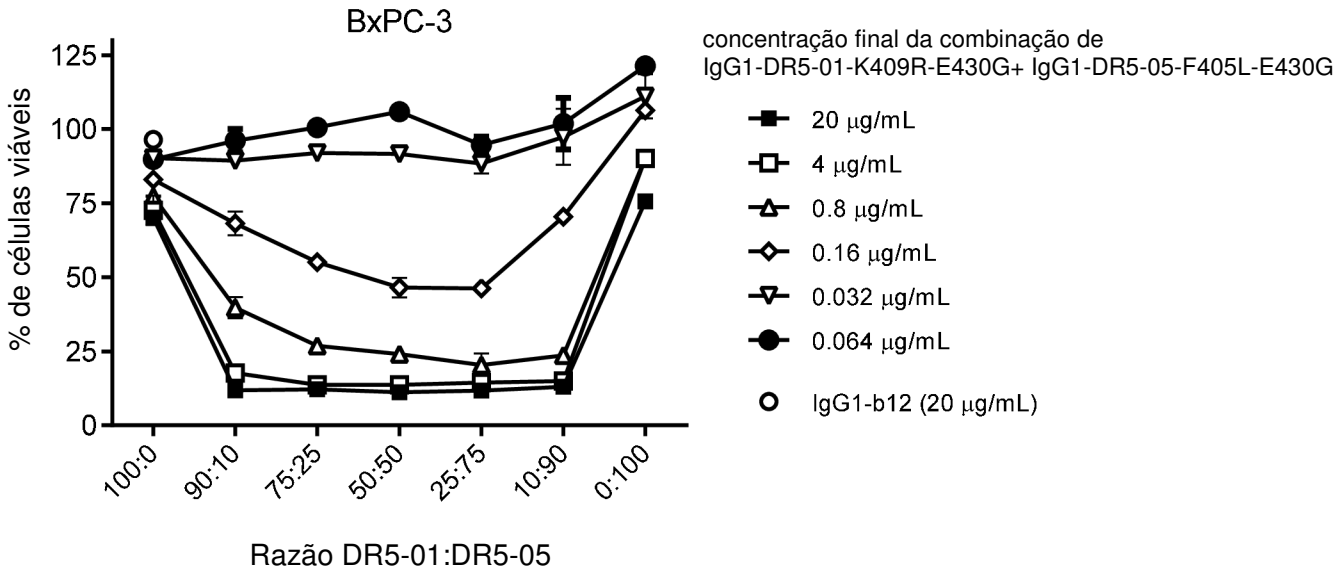
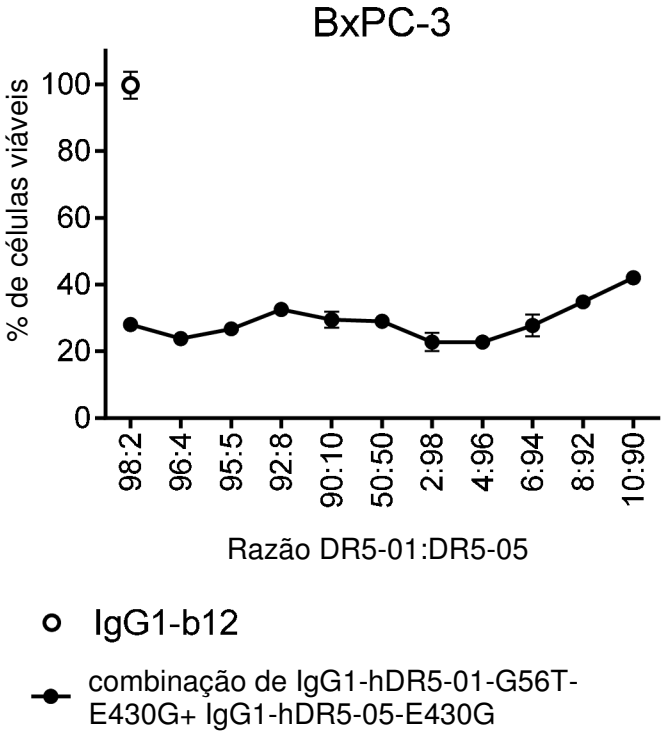

BxPC-3
% de células viáveis
125
100
75
50
25
0
100:0
90:10
75:25
50:50
25:75
10:90
0:100
Razão DR5-01:DR5-05
concentração final da combinação de
IgG1-DR5-01-K409R-E430G+ IgG1-DR5-05-F405L-E430G
20 μg/mL
4 μg/mL
0.8 μg/mL
0.16 μg/mL
0.032 μg/mL
0.064 μg/mL
IgG1-b12 (20 μg/mL)

Figura 16

A


BxPC-3
% de células viáveis
100
80
60
40
20
0
98:2
96:4
95:5
92:8
90:10
50:50
2:98
4:96
6:94
8:92
10:90
Razão DR5-01:DR5-05
IgG1-b12
combinação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+ IgG1-hDR5-05-E430G

B

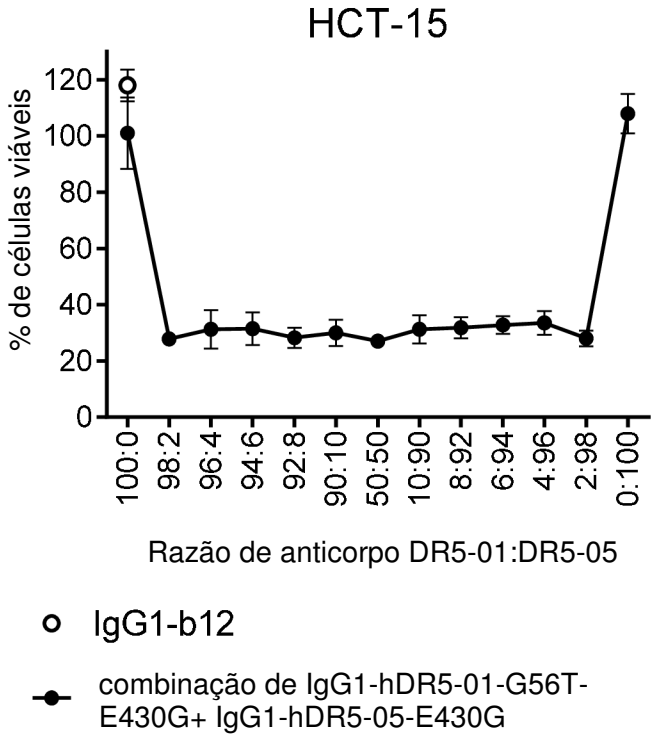
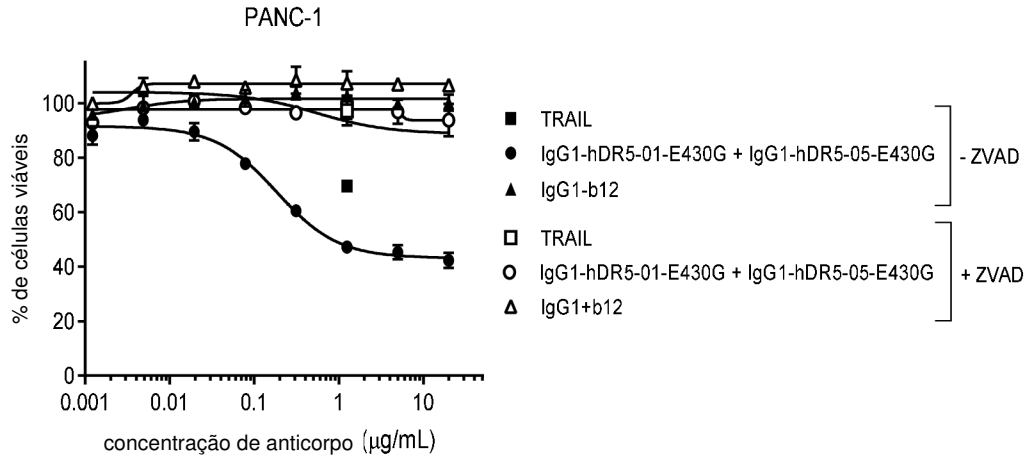
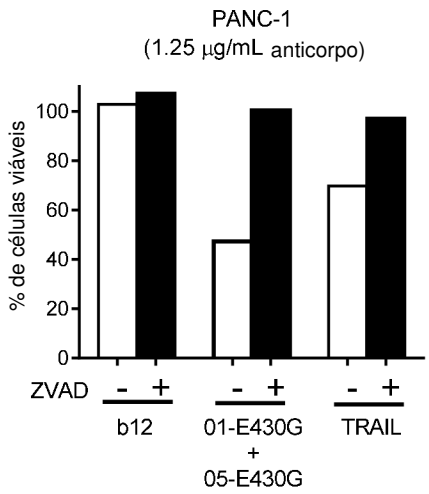

HCT-15
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
100:0
98:2
96:4
94:6
92:8
90:10
50:50
10:90
8:92
6:94
4:96
2:98
0:100
Razão de anticorpo DR5-01:DR5-05
IgG1-b12
combinação de IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+ IgG1-hDR5-05-E430G

Figura 17

A



B



C

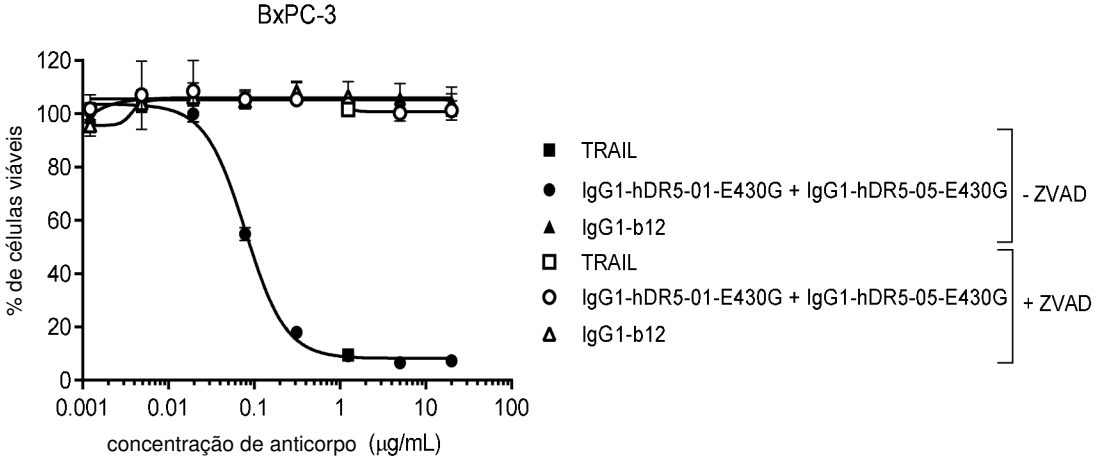


Figura 18

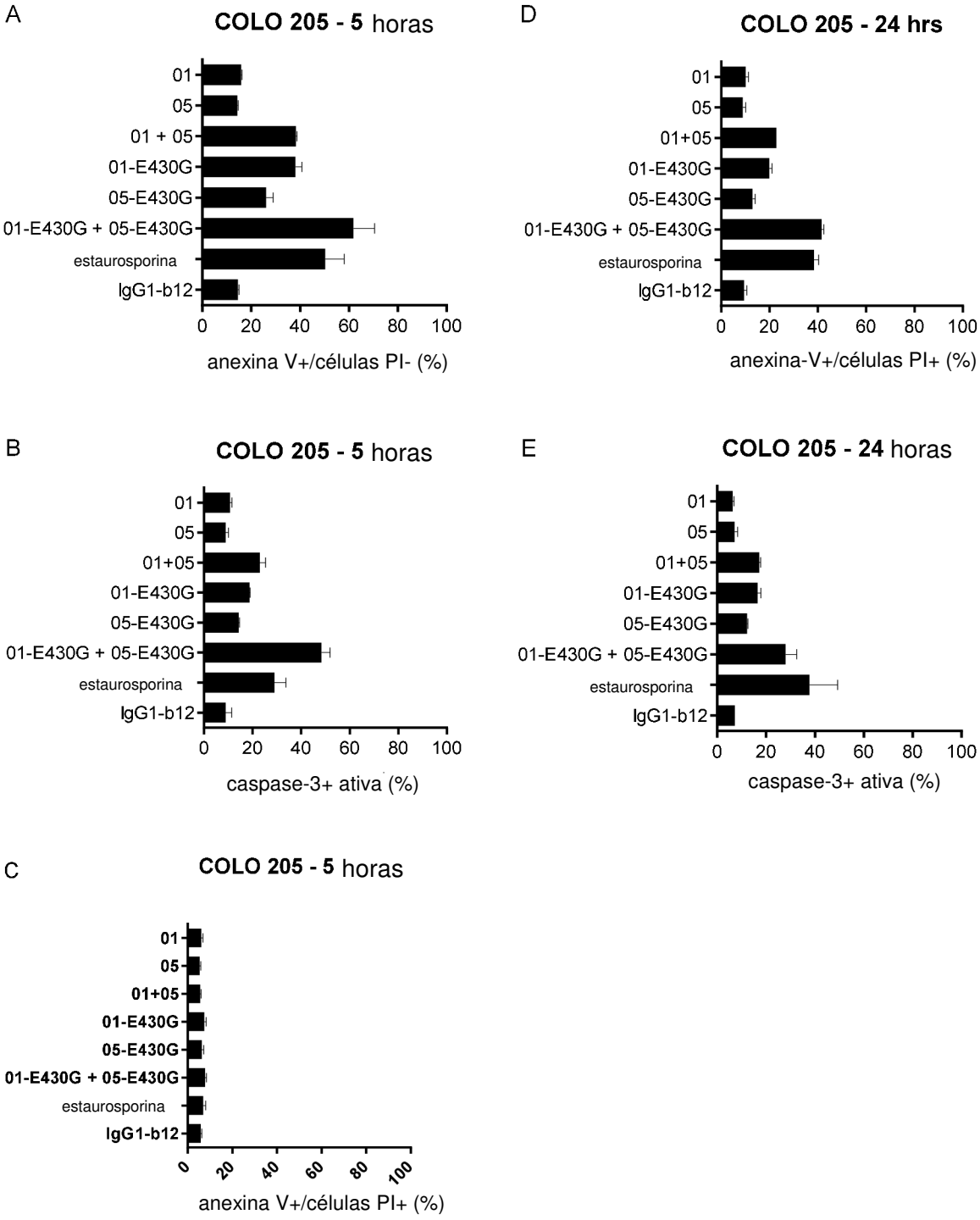

A
COLO 205 - 5 horas
01
05
01 + 05
01-E430G
05-E430G
01-E430G + 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
anexina V+/células PI- (%)
D
COLO 205 - 24 hrs
01
05
01+05
01-E430G
05-E430G
01-E430G + 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
anexina-V+/células PI+ (%)
B
COLO 205 - 5 horas
01
05
01+05
01-E430G
05-E430G
01-E430G + 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
caspase-3+ ativa (%)
E
COLO 205 - 24 horas
01
05
01+05
01-E430G
05-E430G
01-E430G + 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
caspase-3+ ativa (%)
C
COLO 205 - 5 horas
01
05
01+05
01-E430G
05-E430G
01-E430G + 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
anexina V+/células PI+ (%)

Figura 19

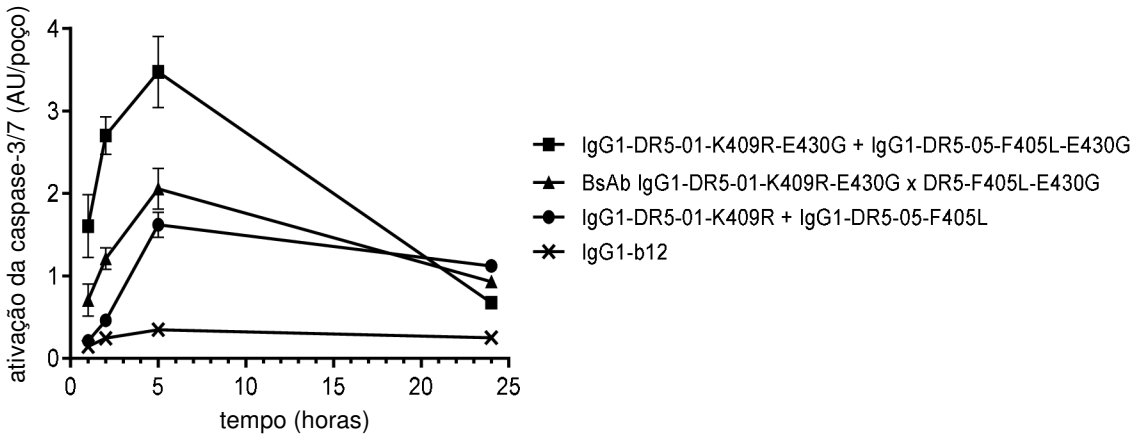

ativação da caspase-3/7 (AU/poço)
0
1
2
3
4
0
5
10
15
20
25
tempo (horas)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G
BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G x DR5-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L
IgG1-b12

Figura 20

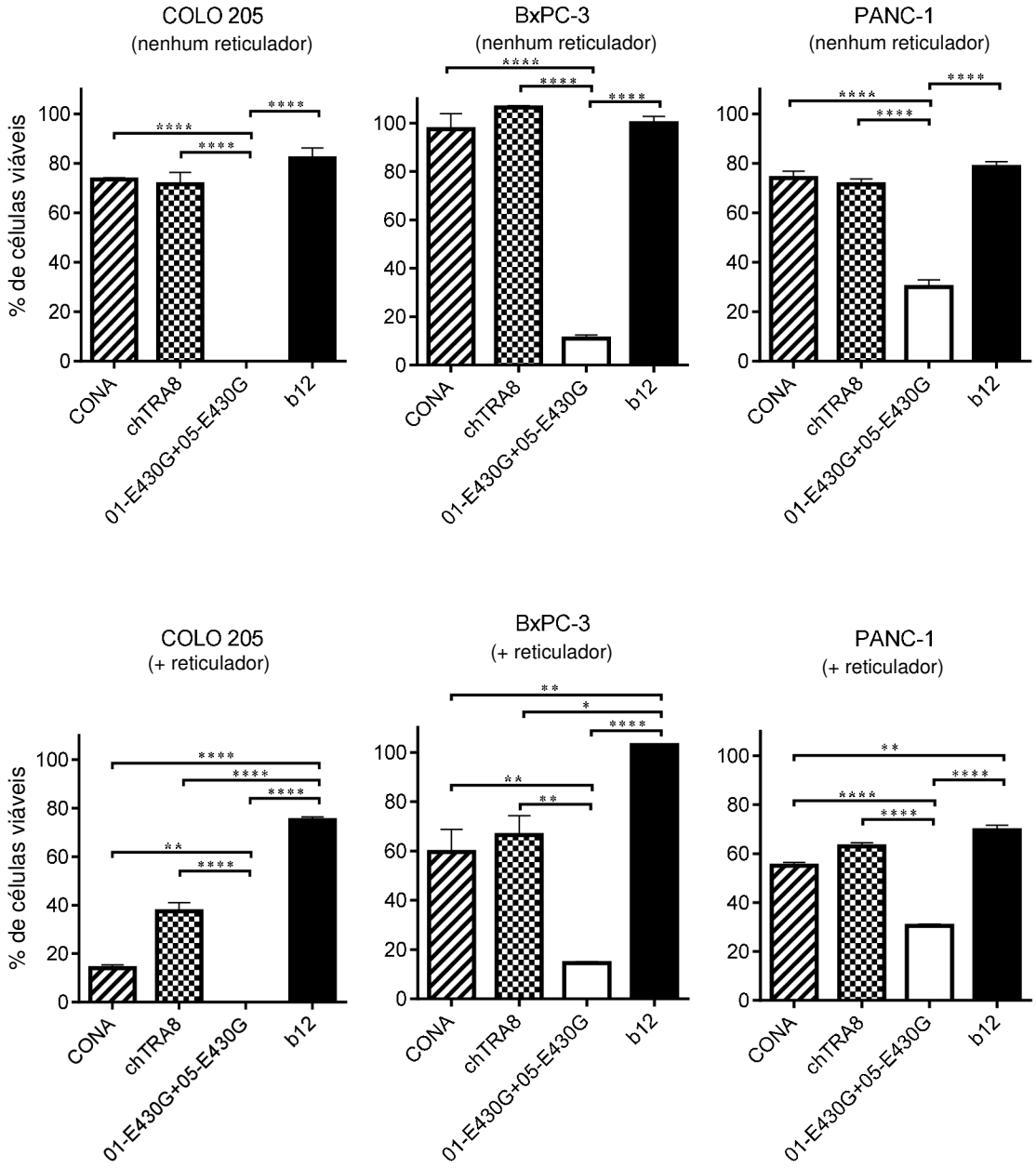

COLO 205
(nenhum reticulador)
BxPC-3
(nenhum reticulador)
PANC-1
(nenhum reticulador)
% de células viáveis
0
20
40
60
80
100
****
CONA
chTRA8
01-E430G+05-E430G
b12
COLO 205
(+ reticulador)
BxPC-3
(+ reticulador)
PANC-1
(+ reticulador)
**
*

Figura 21

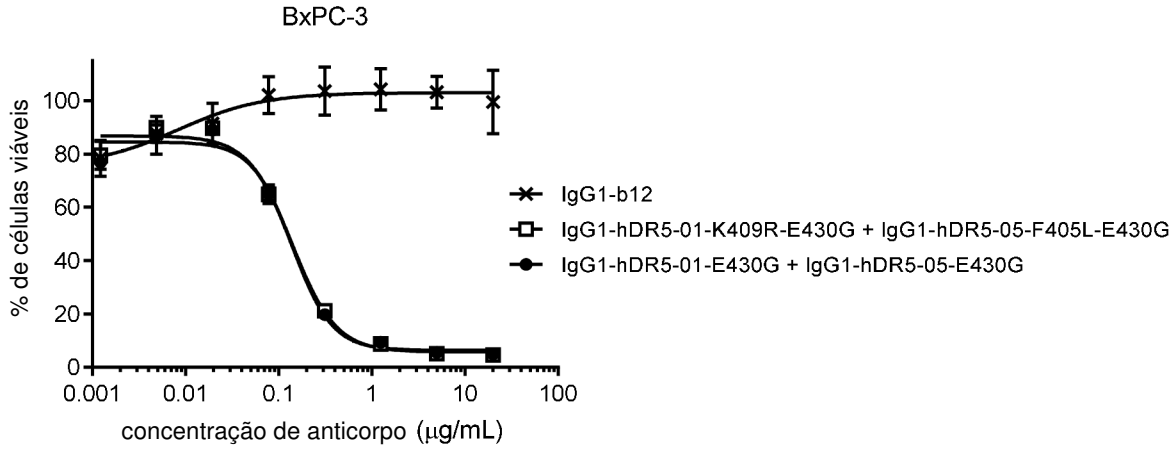

BxPC-3
% de células viáveis
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
concentração de anticorpo (μg/mL)
IgG1-b12
IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G
IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G

Figura 22

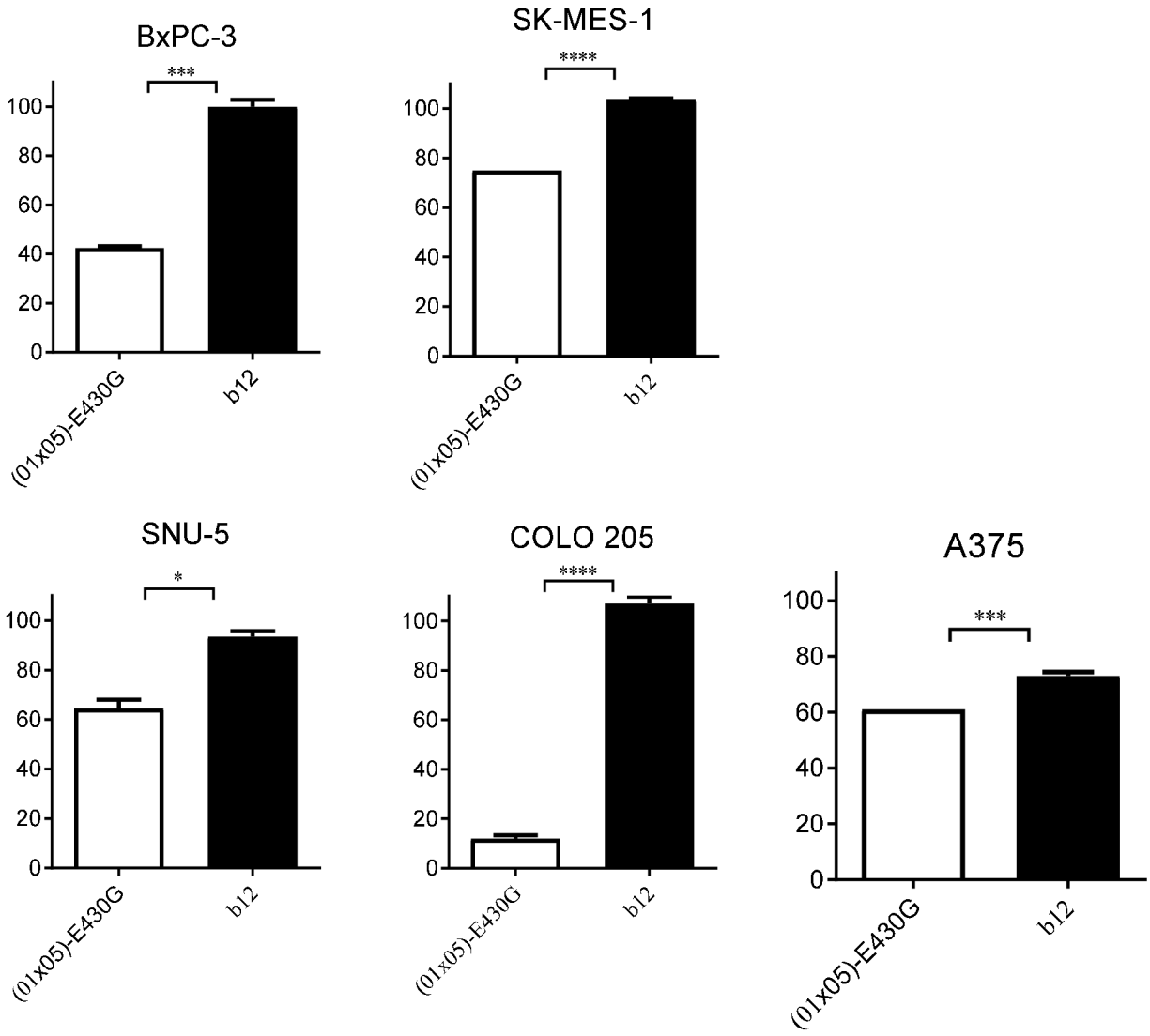

BxPC-3
***
100
80
60
40
20
0
(01x05)-E430G
b12
SK-MES-1
****
100
80
60
40
20
0
(01x05)-E430G
b12
SNU-5
*
100
80
60
40
20
0
(01x05)-E430G
b12
COLO 205
****
100
80
60
40
20
0
(01x05)-E430G
b12
A375
***
100
80
60
40
20
0
(01x05)-E430G
b12

Figura 23

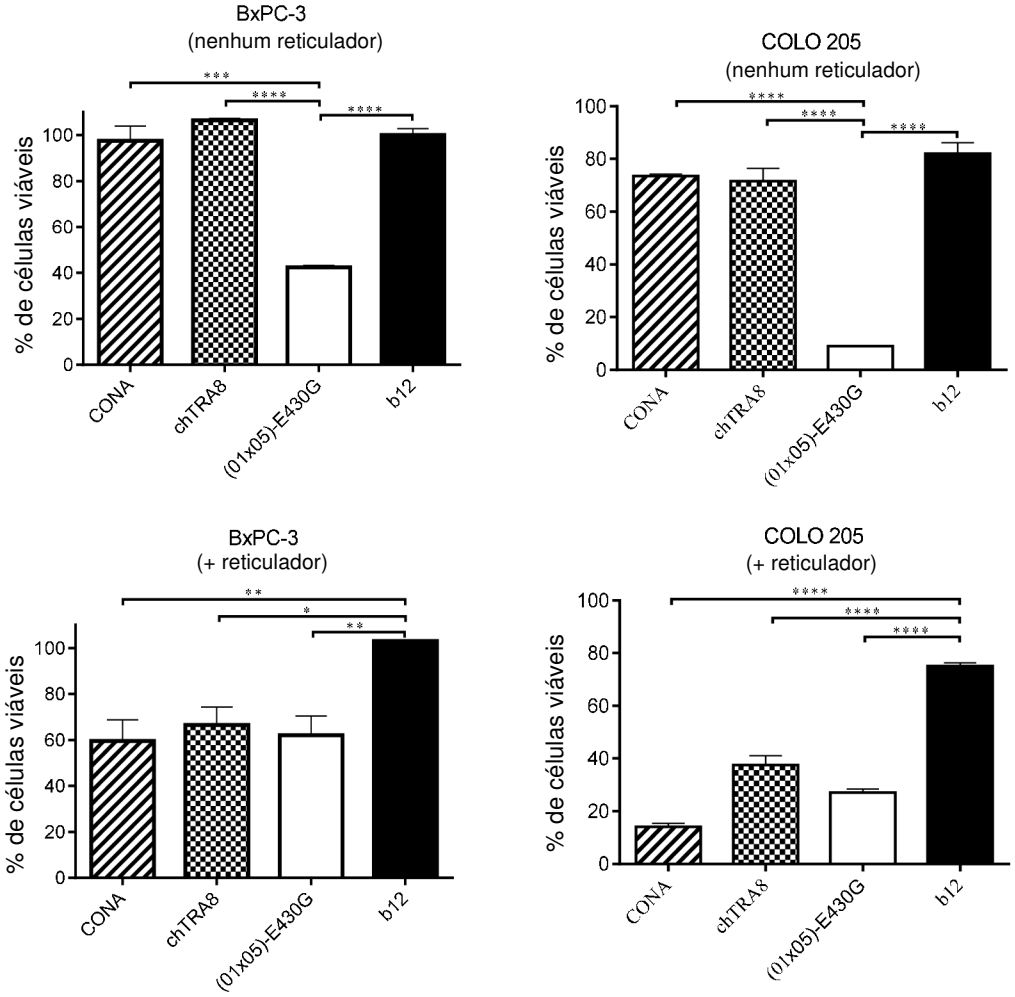

BxPC-3
(nenhum reticulador)
% de células viáveis
CONA
chTRA8
(01x05)-E430G
b12
COLO 205
(nenhum reticulador)
BxPC-3
(+ reticulador)
COLO 205
(+ reticulador)

Figura 24

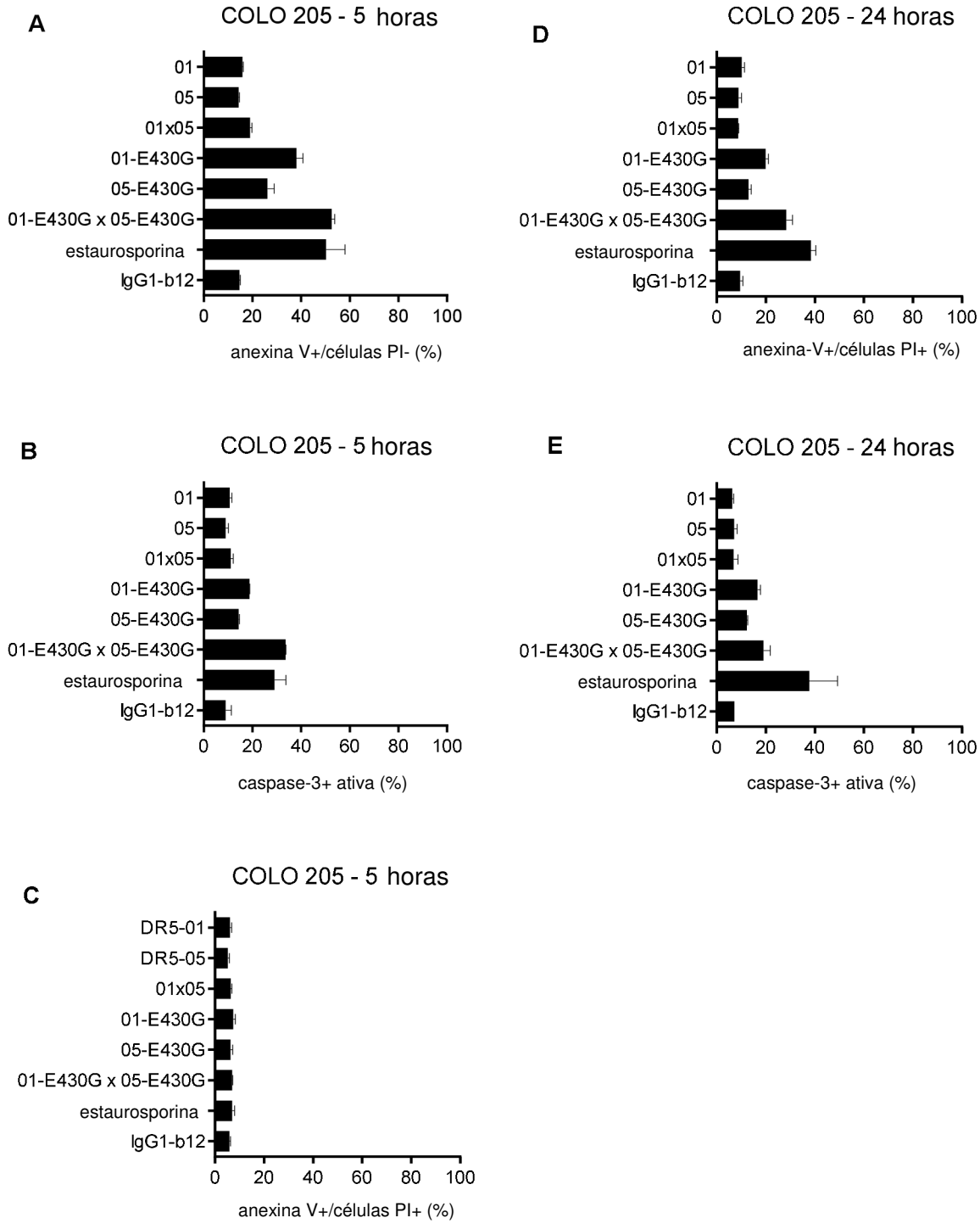
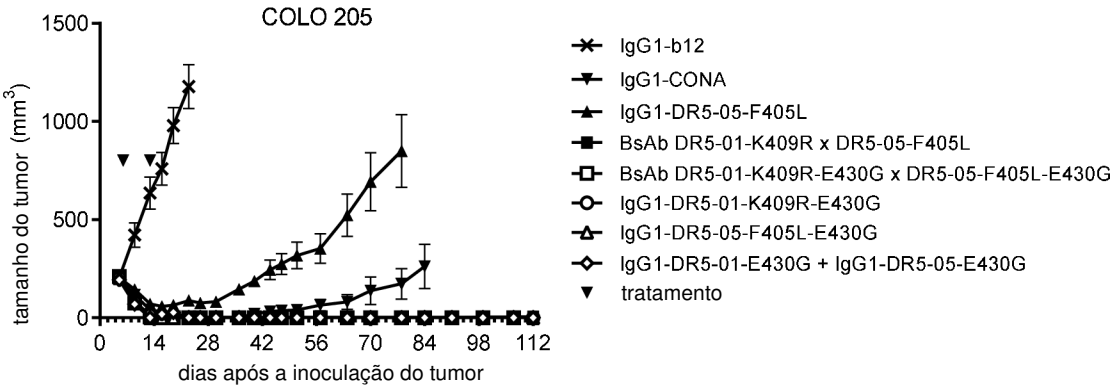

A
COLO 205 - 5 horas
01
05
01x05
01-E430G
05-E430G
01-E430G x 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
anexina V+/células PI- (%)
D
COLO 205 - 24 horas
01
05
01x05
01-E430G
05-E430G
01-E430G x 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
anexina-V+/células PI+ (%)
B
COLO 205 - 5 horas
01
05
01x05
01-E430G
05-E430G
01-E430G x 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
caspase-3+ ativa (%)
E
COLO 205 - 24 horas
01
05
01x05
01-E430G
05-E430G
01-E430G x 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
caspase-3+ ativa (%)
C
COLO 205 - 5 horas
DR5-01
DR5-05
01x05
01-E430G
05-E430G
01-E430G x 05-E430G
estaurosporina
IgG1-b12
0 20 40 60 80 100
anexina V+/células PI+ (%)

Figura 25

A


COLO 205
tamanho do tumor (mm3)
1500
1000
500
0
0
14
28
42
56
70
84
98
112
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12
IgG1-CONA
IgG1-DR5-05-F405L
BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L
BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-K409R-E430G
IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-E430G + IgG1-DR5-05-E430G
tratamento

B

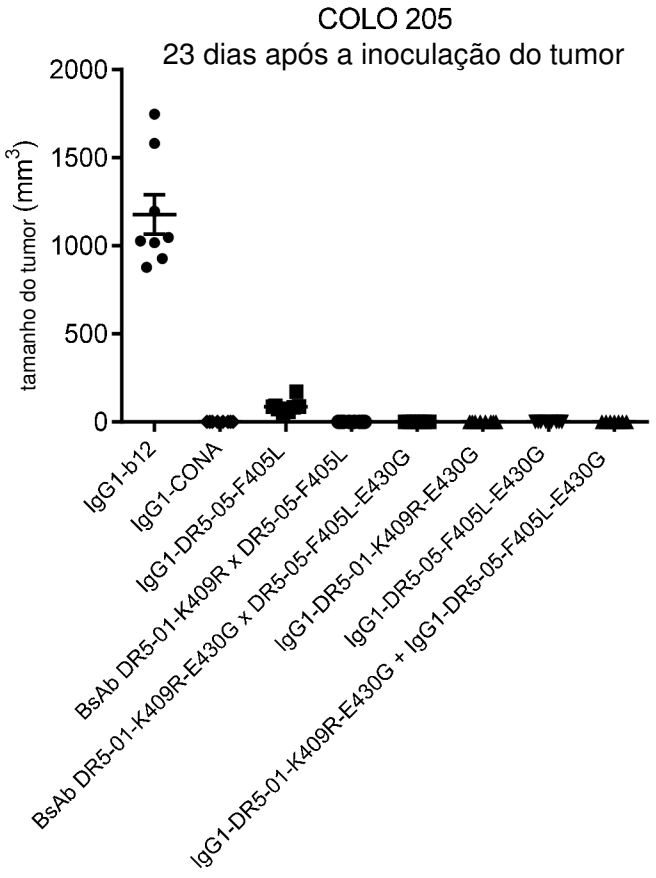

COLO 205
23 dias após a inoculação do tumor
tamanho do tumor (mm3)
2000
1500
1000
500
0
IgG1-b12
IgG1-CONA
IgG1-DR5-05-F405L
BsAb DR5-01-K409R x DR5-05-F405L
BsAb DR5-01-K409R-E430G x DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-K409R-E430G
IgG1-DR5-05-F405L-E430G
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G

Figura 25 (continuação)

C

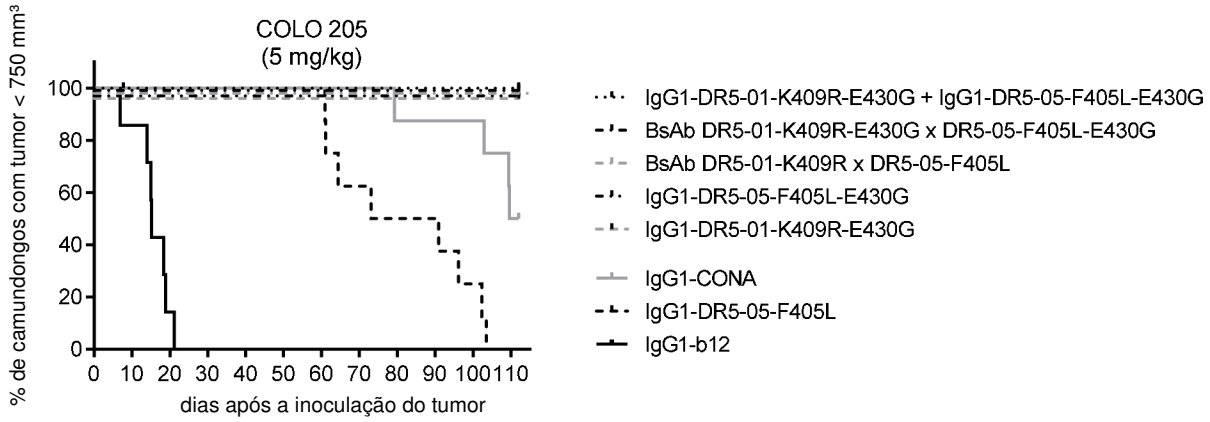
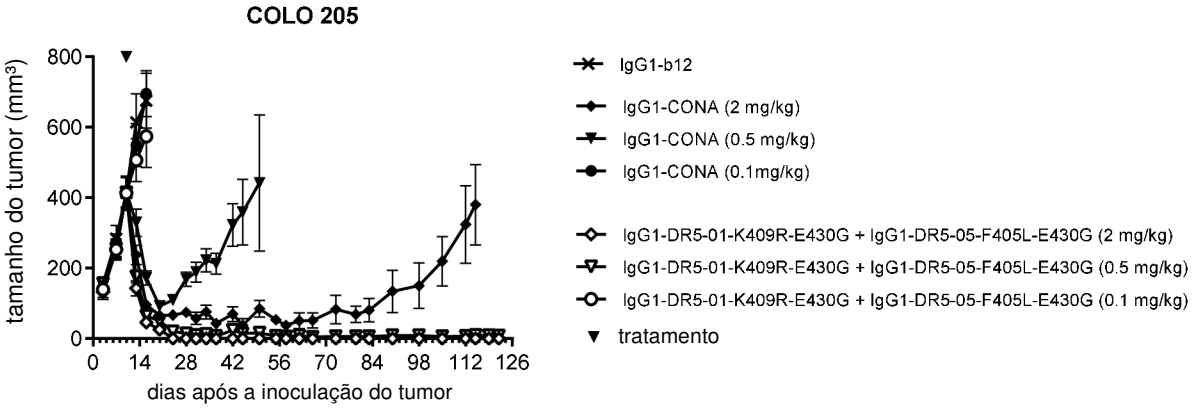


Figura 26

A


COLO 205
tamanho do tumor (mm³)
800
600
400
200
0
0 14 28 42 56 70 84 98 112 126
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12
IgG1-CONA (2 mg/kg)
IgG1-CONA (0.5 mg/kg)
IgG1-CONA (0.1mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.1 mg/kg)
tratamento

B

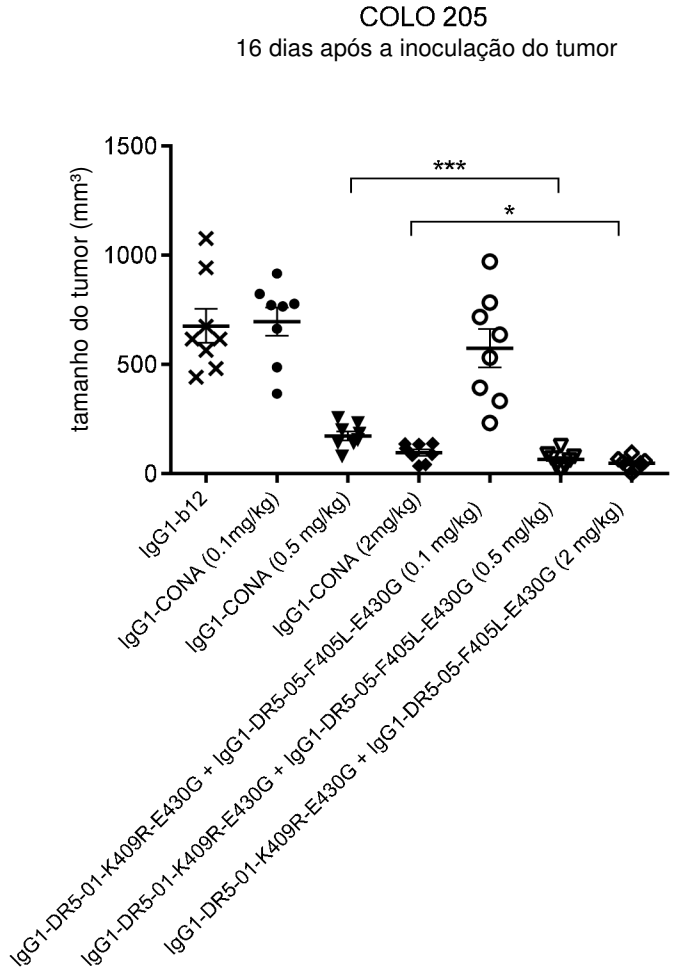

COLO 205
16 dias após a inoculação do tumor
tamanho do tumor (mm³)
1500
1000
500
0
***
*
IgG1-b12
IgG1-CONA (0.1mg/kg)
IgG1-CONA (0.5 mg/kg)
IgG1-CONA (2mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.1 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)

Figura 26 (continuação)

C

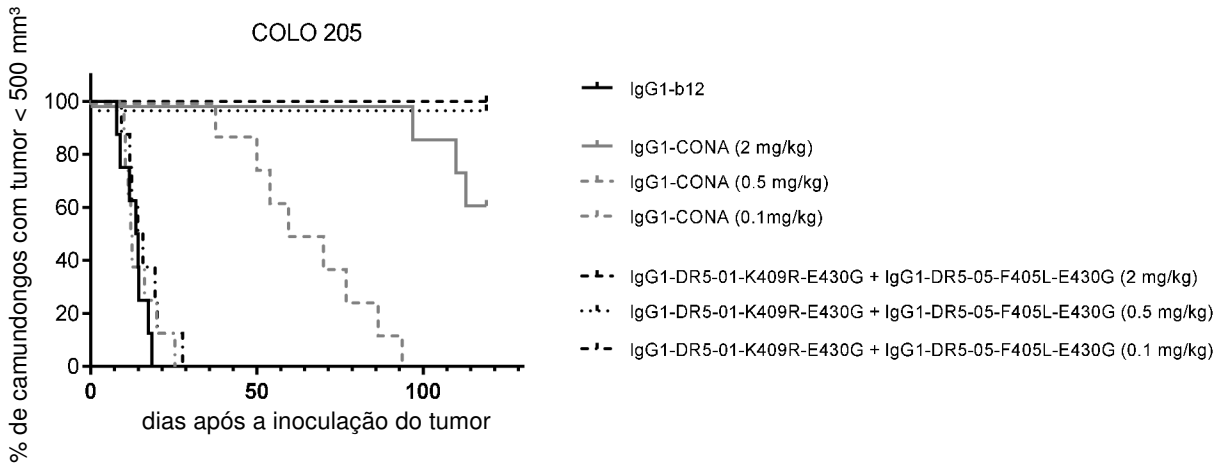


Figura 27

A

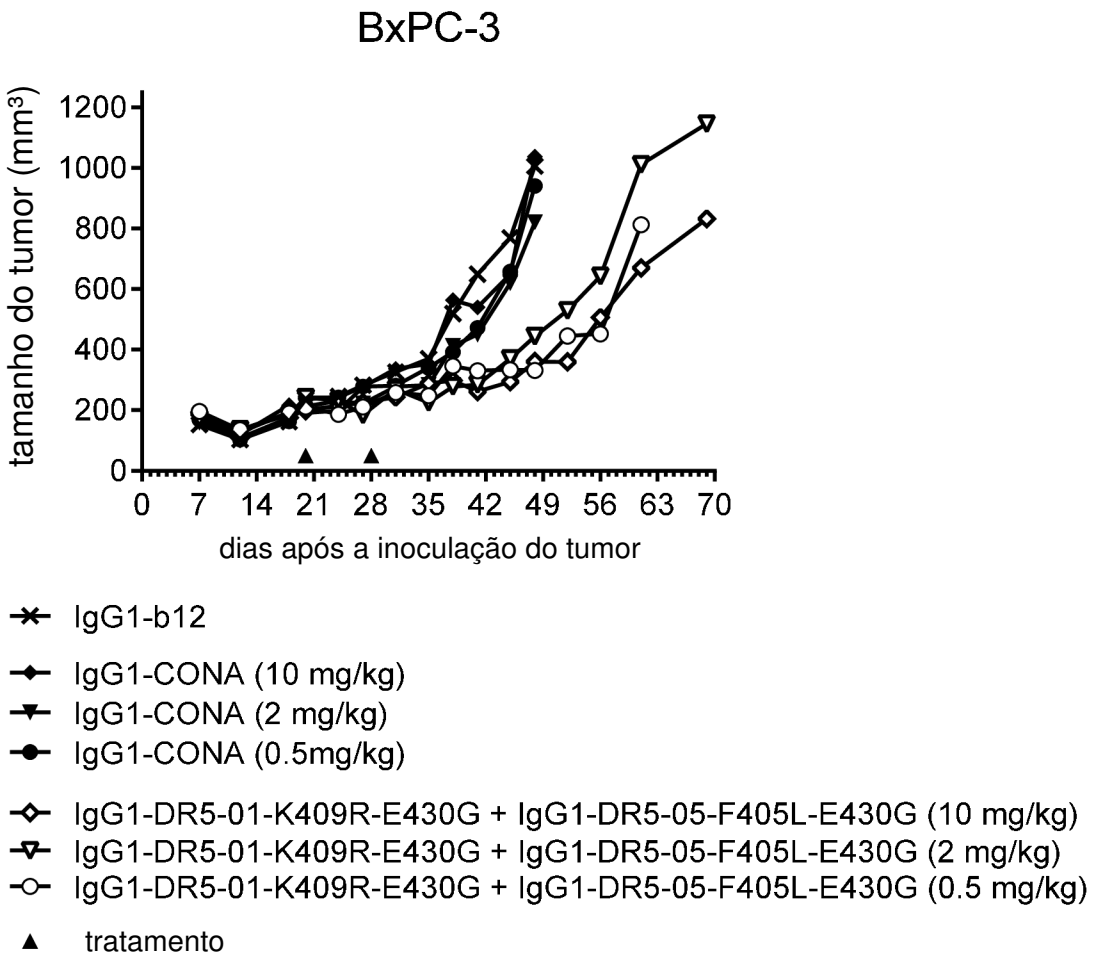

BxPC-3
tamanho do tumor (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12
IgG1-CONA (10 mg/kg)
IgG1-CONA (2 mg/kg)
IgG1-CONA (0.5mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (10 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)
tratamento

Figura 27 continuação

B

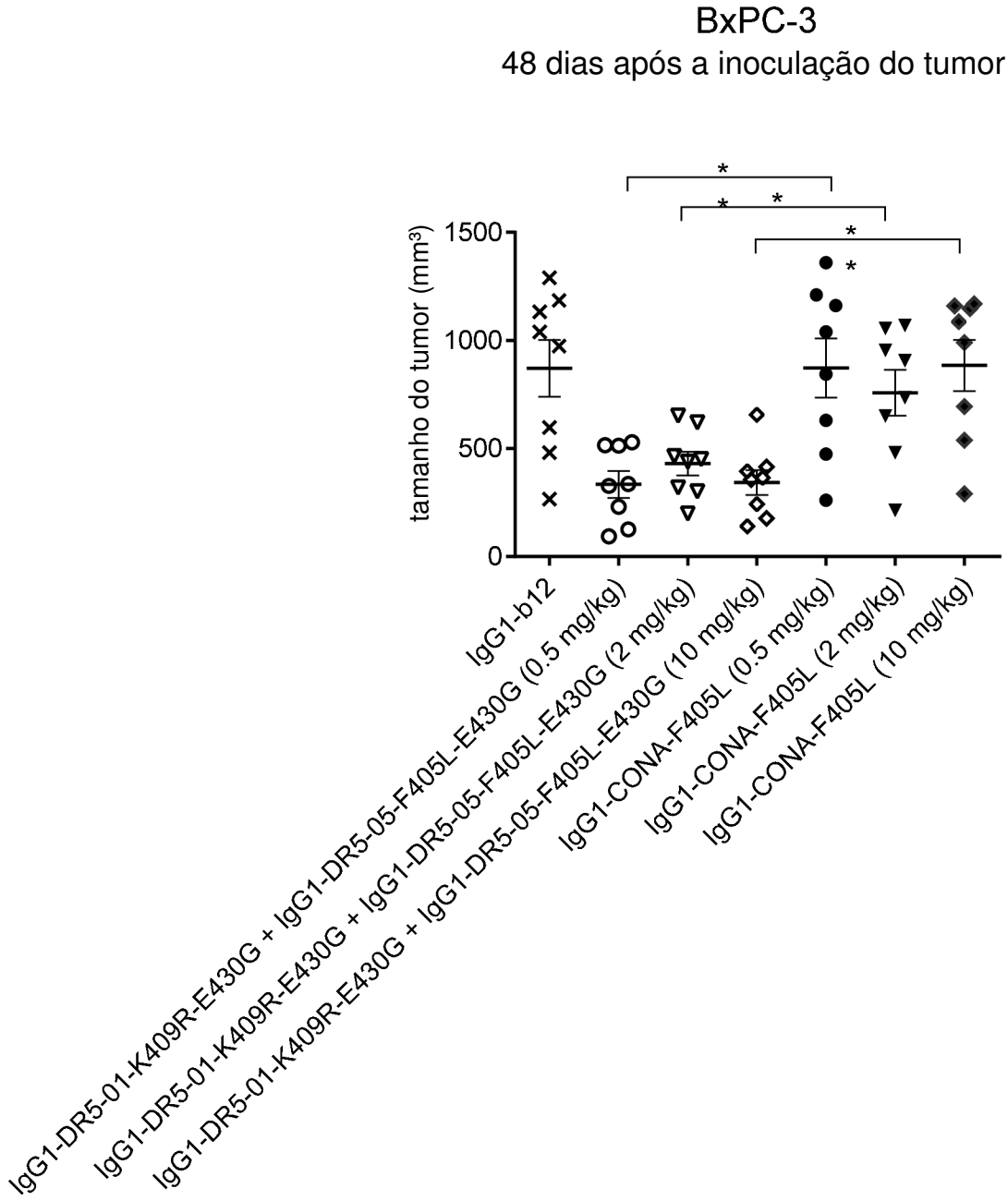


Figura 27 continuação

C

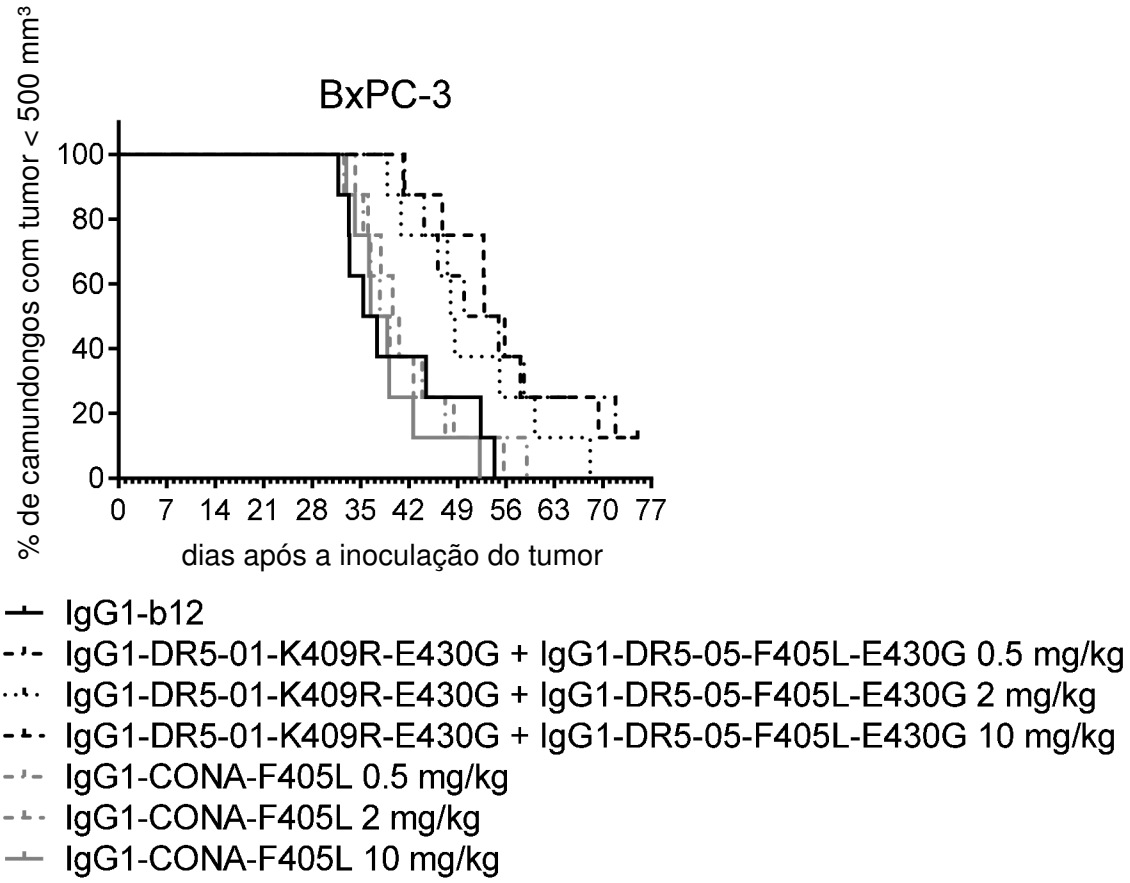


Figura 28

A

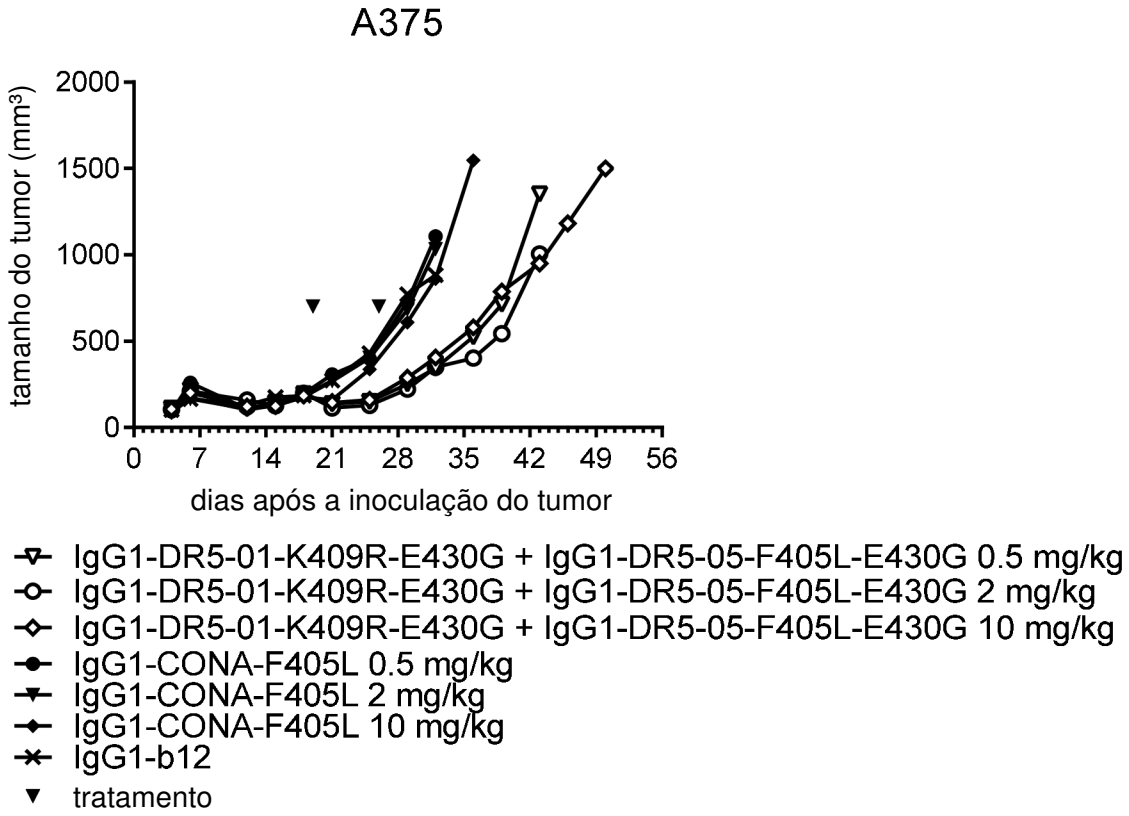

A375
tamanho do tumor (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
dias após a inoculação do tumor
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 0.5 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 2 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 10 mg/kg
IgG1-CONA-F405L 0.5 mg/kg
IgG1-CONA-F405L 2 mg/kg
IgG1-CONA-F405L 10 mg/kg
IgG1-b12
tratamento

Figura 28 continuação

B

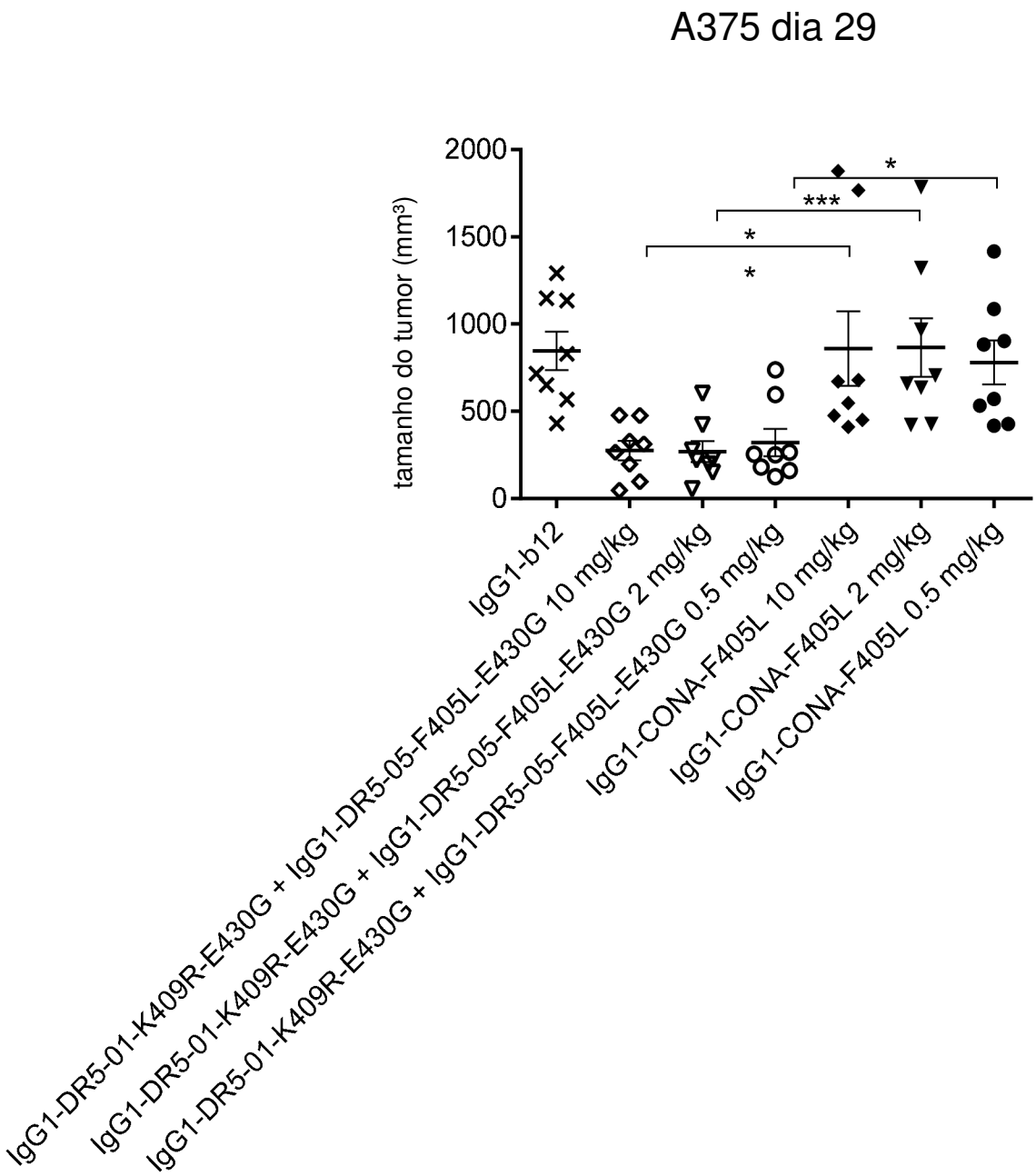
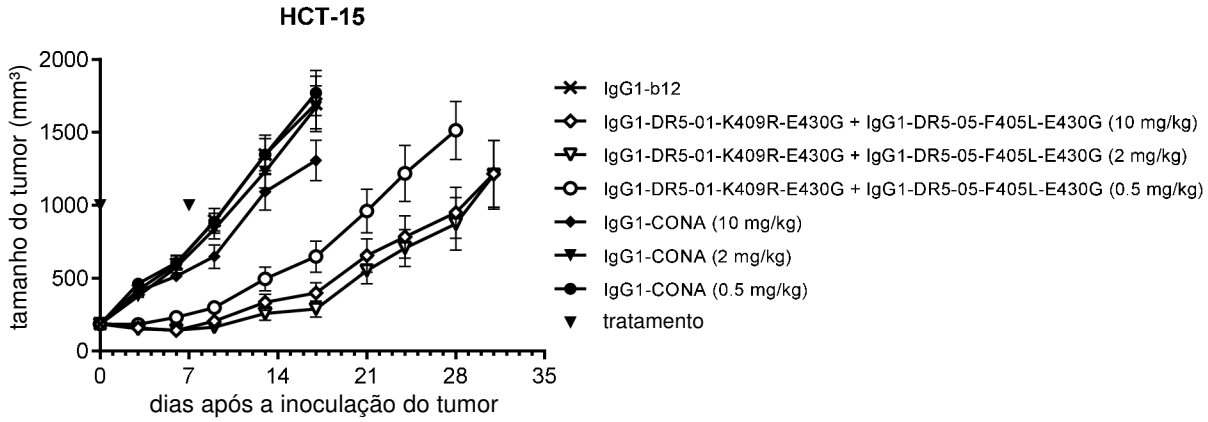


Figura 29

A


HCT-15
tamanho do tumor (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (10 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)
IgG1-CONA (10 mg/kg)
IgG1-CONA (2 mg/kg)
IgG1-CONA (0.5 mg/kg)
tratamento

B

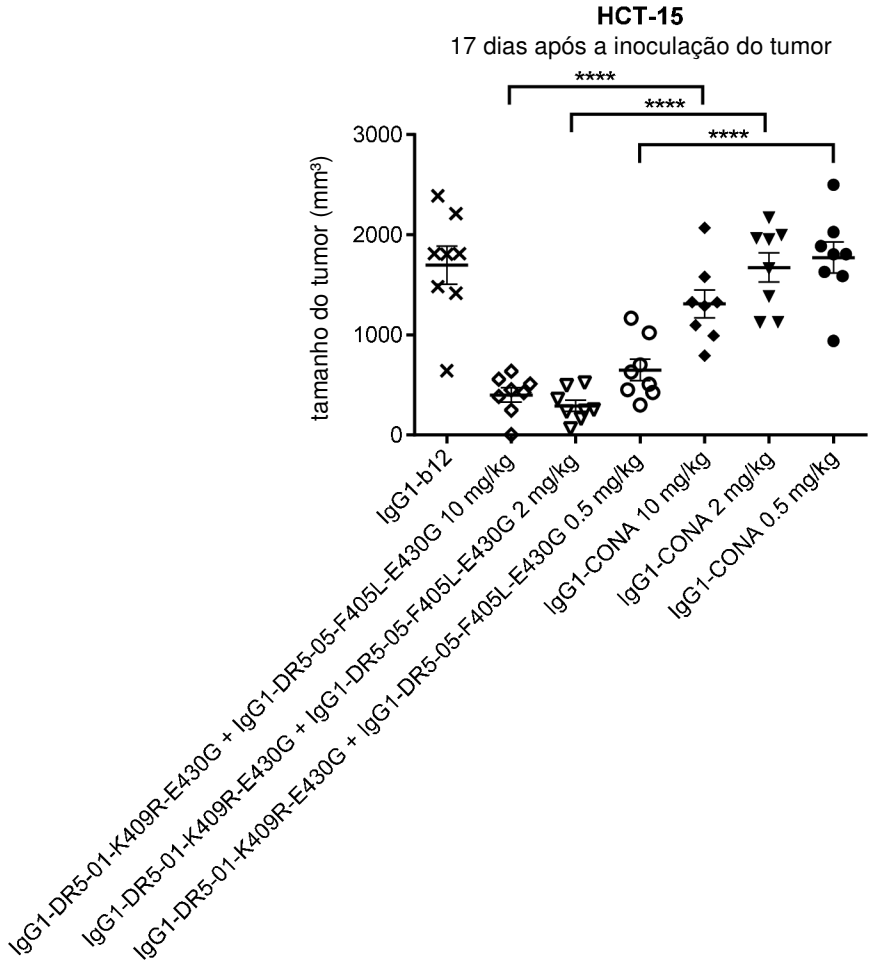

HCT-15
17 dias após a inoculação do tumor
****
****
****
tamanho do tumor (mm³)
3000
2000
1000
0
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 10 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 2 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 0.5 mg/kg
IgG1-CONA 10 mg/kg
IgG1-CONA 2 mg/kg
IgG1-CONA 0.5 mg/kg

Figura 29 continuação

C

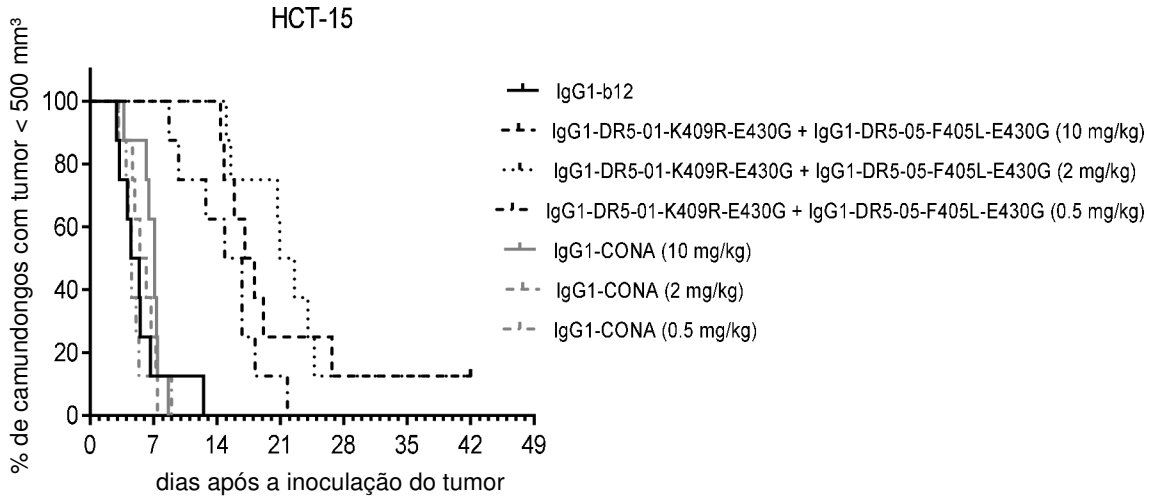
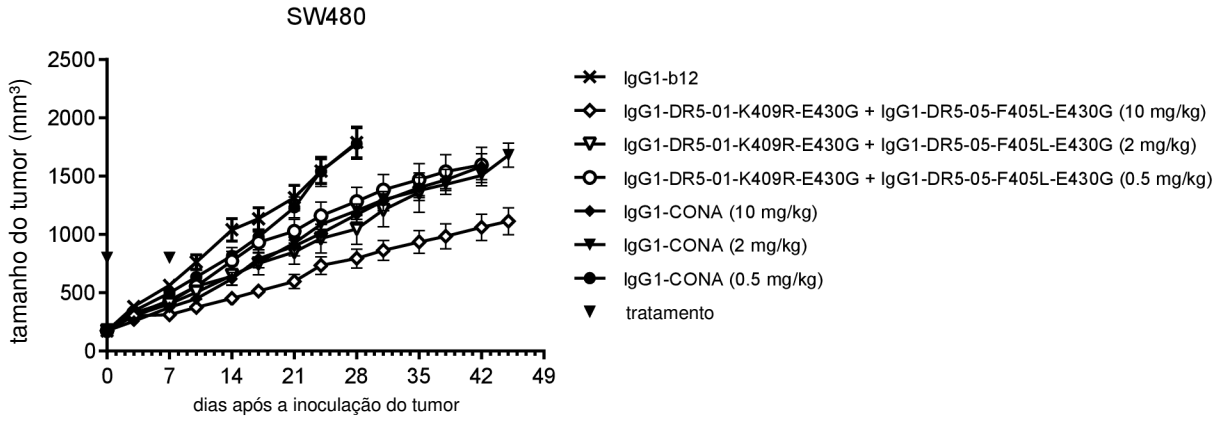


Figura 30

A


SW480
tamanho do tumor (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
49
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (10 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)
IgG1-CONA (10 mg/kg)
IgG1-CONA (2 mg/kg)
IgG1-CONA (0.5 mg/kg)
tratamento

B

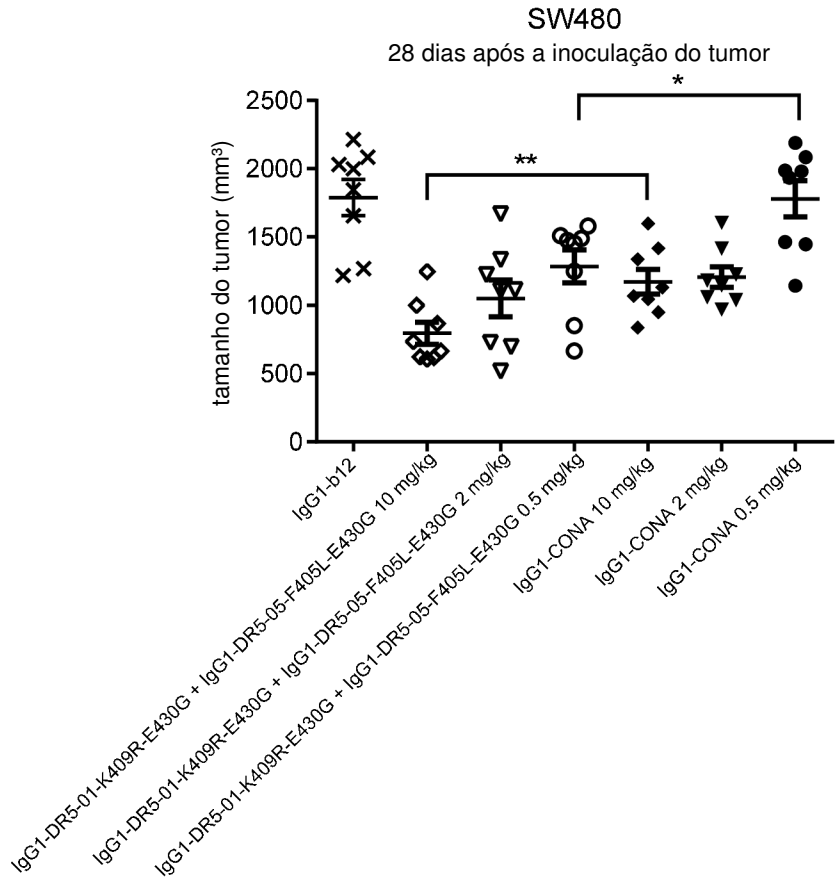

SW480
28 dias após a inoculação do tumor
tamanho do tumor (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
*
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 10 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 2 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 0.5 mg/kg
IgG1-CONA 10 mg/kg
IgG1-CONA 2 mg/kg
IgG1-CONA 0.5 mg/kg

Figura 30 continuação

C

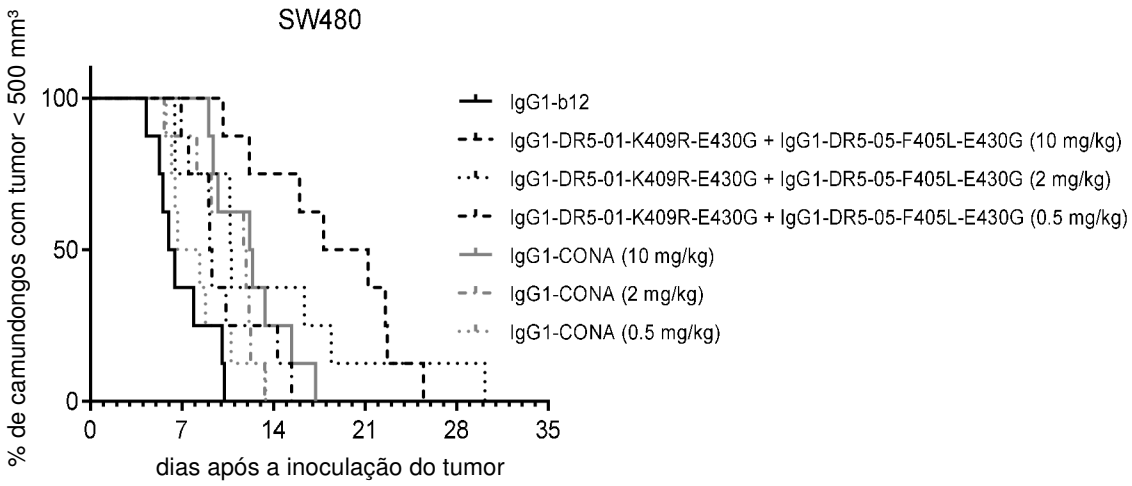
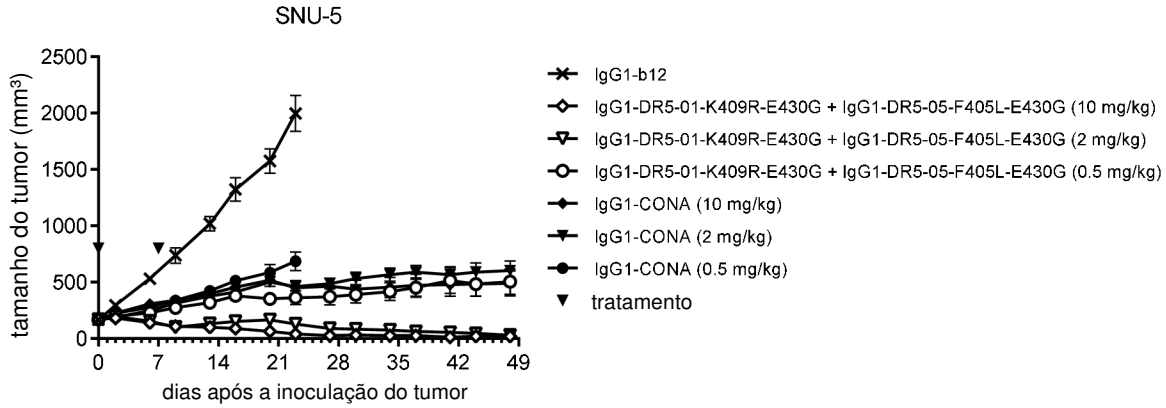


Figura 31

A


SNU-5
tamanho do tumor (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
49
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (10 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)
IgG1-CONA (10 mg/kg)
IgG1-CONA (2 mg/kg)
IgG1-CONA (0.5 mg/kg)
tratamento

B

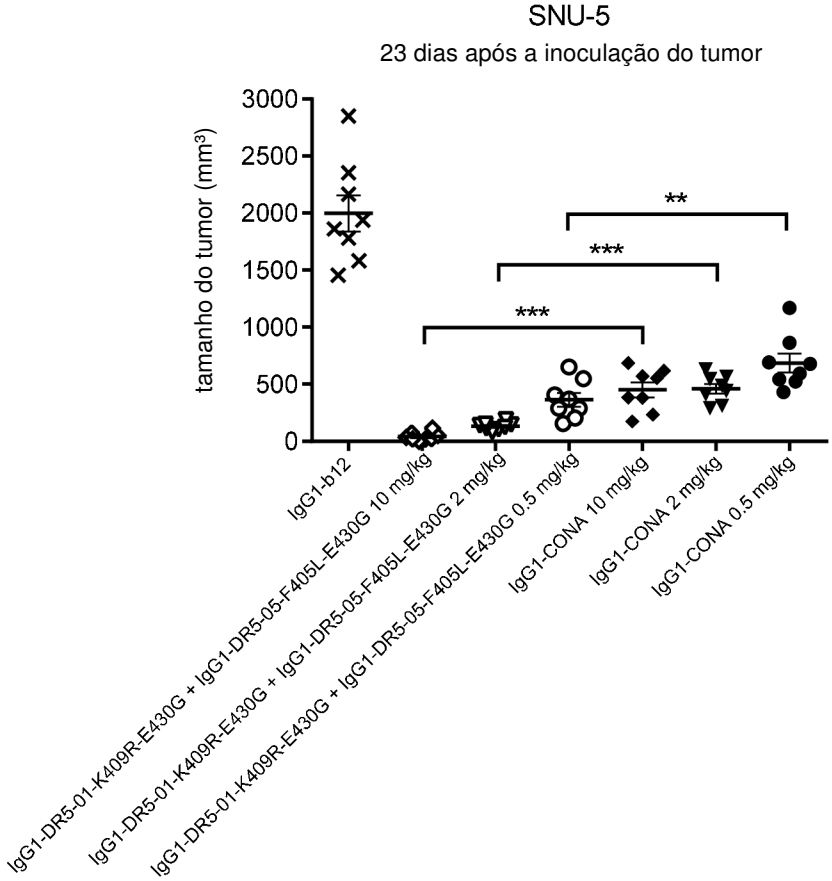

SNU-5
23 dias após a inoculação do tumor
tamanho do tumor (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
**
***
***
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 10 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 2 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 0.5 mg/kg
IgG1-CONA 10 mg/kg
IgG1-CONA 2 mg/kg
IgG1-CONA 0.5 mg/kg

Figura 31 continuação

C

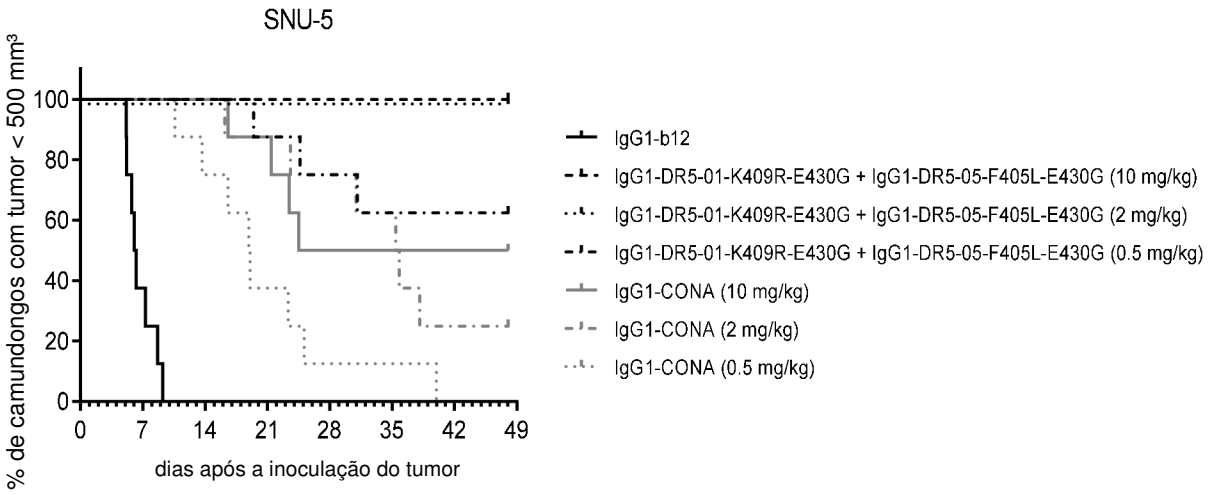
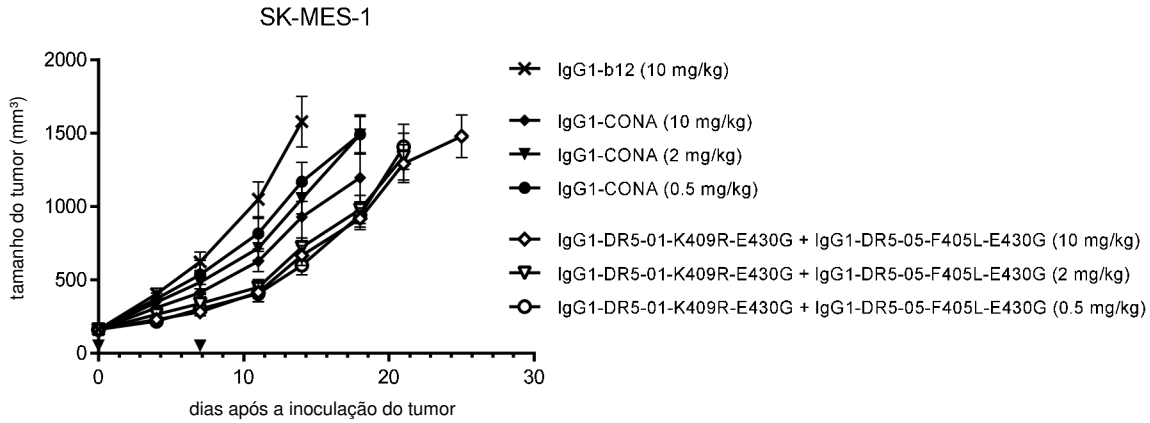


Figura 32

A


SK-MES-1
tamanho do tumor (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
dias após a inoculação do tumor
IgG1-b12 (10 mg/kg)
IgG1-CONA (10 mg/kg)
IgG1-CONA (2 mg/kg)
IgG1-CONA (0.5 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (10 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (2 mg/kg)
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (0.5 mg/kg)

B

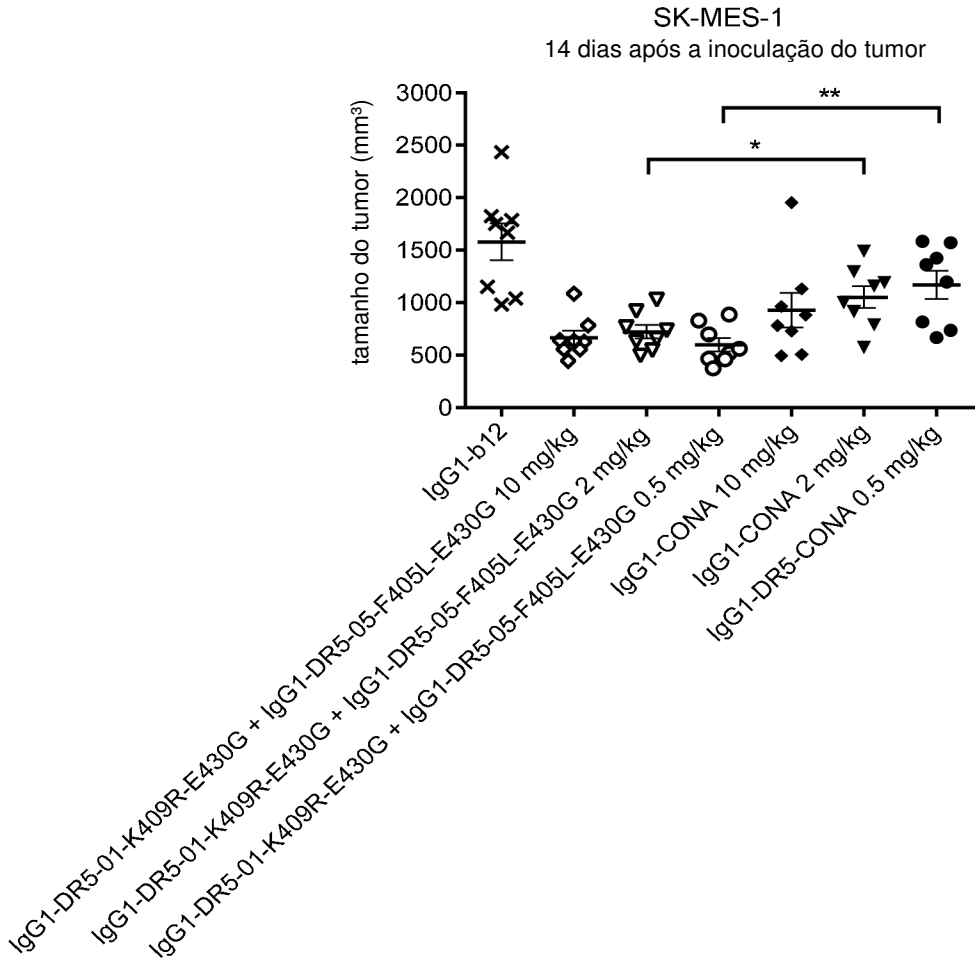

SK-MES-1
14 dias após a inoculação do tumor
tamanho do tumor (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
**
*
IgG1-b12
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 10 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 2 mg/kg
IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G 0.5 mg/kg
IgG1-CONA 10 mg/kg
IgG1-CONA 2 mg/kg
IgG1-DR5-CONA 0.5 mg/kg

Figura 32 continuação

C

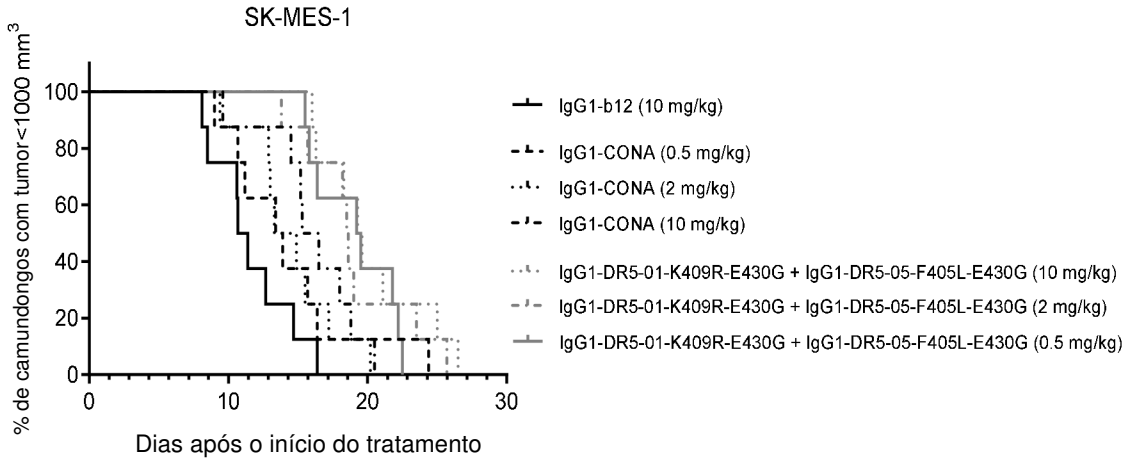


Figura 33

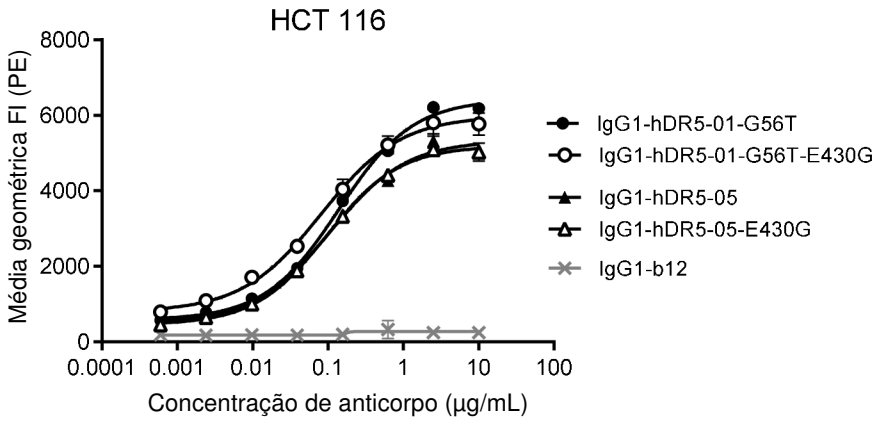

HCT 116
Média geométrica FI (PE)
8000
6000
4000
2000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de anticorpo (µg/mL)
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-b12

Figura 34

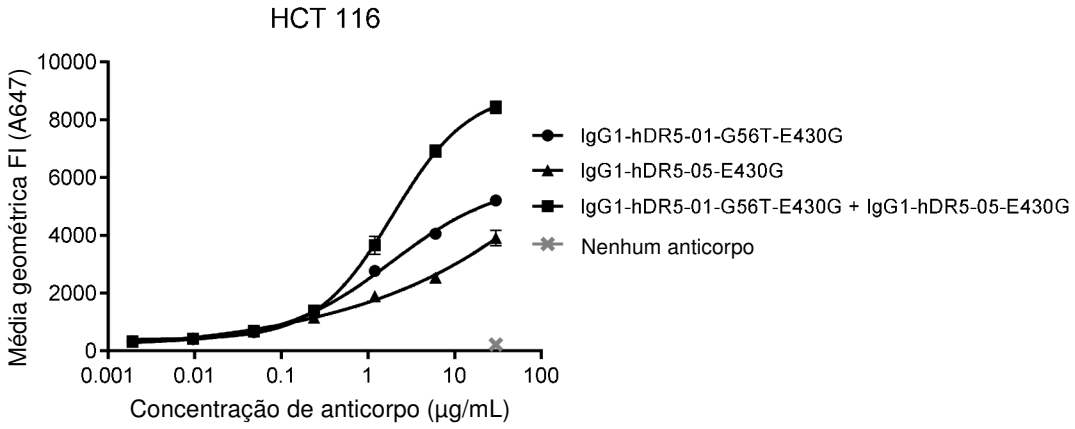

HCT 116
Média geométrica FI (A647)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de anticorpo (µg/mL)
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
Nenhum anticorpo

Figura 35

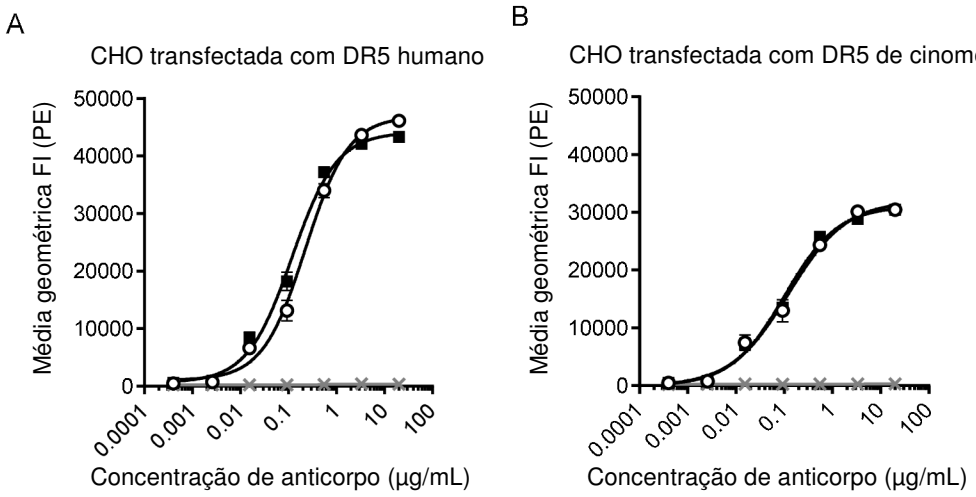

A
CHO transfectada com DR5 humano
Média geométrica FI (PE)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de anticorpo (µg/mL)
B
CHO transfectada com DR5 de cinomolgo
Média geométrica FI (PE)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de anticorpo (µg/mL)

Figura 36

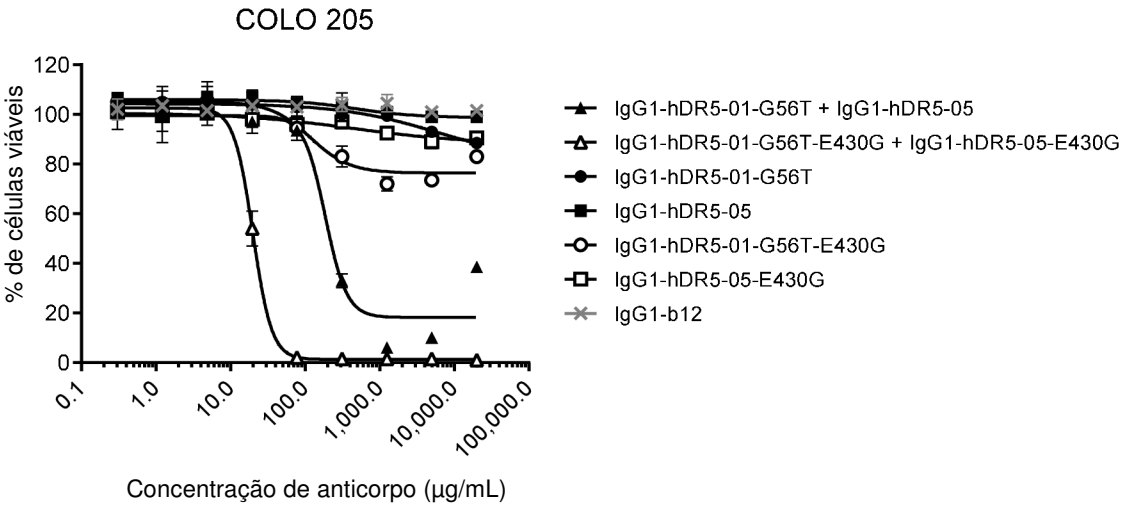
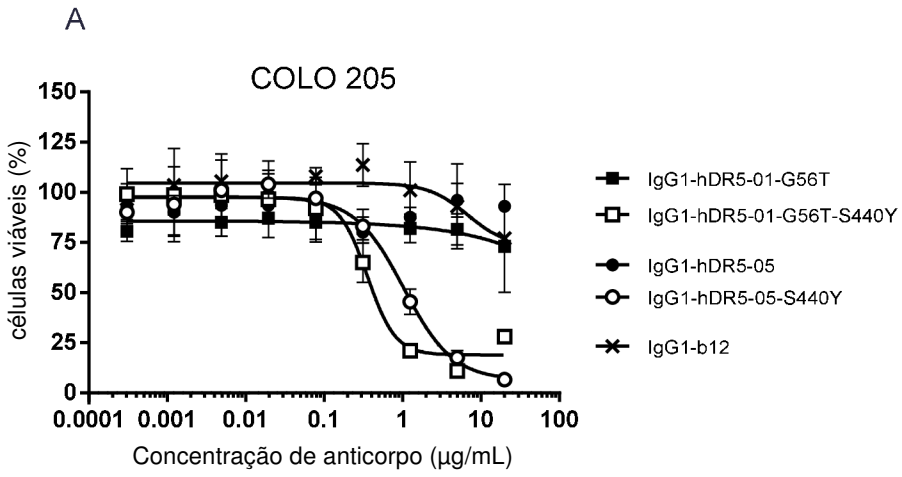

COLO 205
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1.0
10.0
100.0
1,000.0
10,000.0
100,000.0
Concentração de anticorpo (µg/mL)
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-b12

Figura 37


A
COLO 205
células viáveis (%)
150
125
100
75
50
25
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentração de anticorpo (µg/mL)
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-01-G56T-S440Y
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-05-S440Y
IgG1-b12

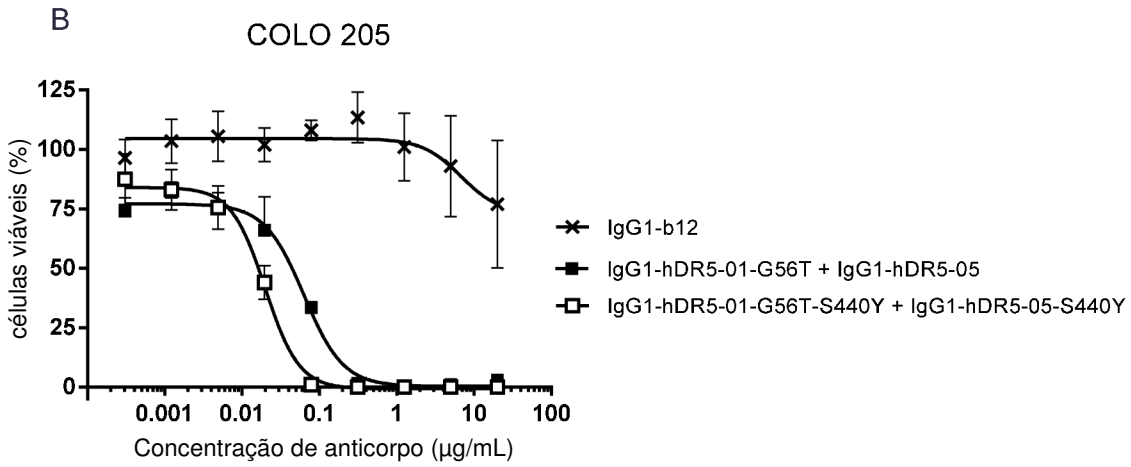
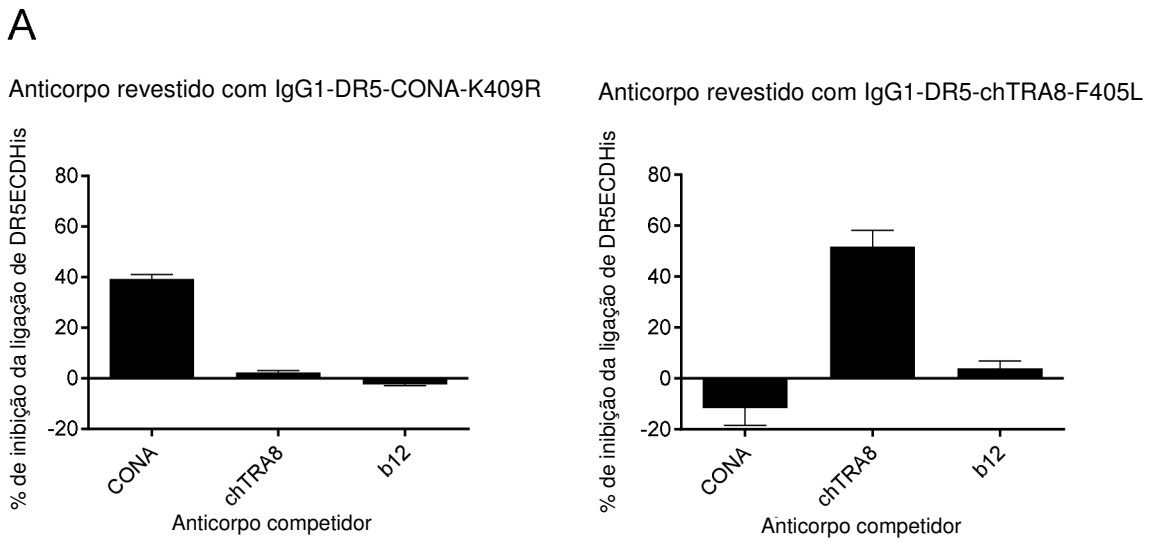

B
COLO 205
células viáveis (%)
125
100
75
50
25
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentração de anticorpo (µg/mL)
IgG1-b12
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-S440Y + IgG1-hDR5-05-S440Y

Figura 38


A
Anticorpo revestido com IgG1-DR5-CONA-K409R
% de inibição da ligação de DR5ECDHis
80
60
40
20
0
-20
CONA
chTRA8
b12
Anticorpo competidor
Anticorpo revestido com IgG1-DR5-chTRA8-F405L
% de inibição da ligação de DR5ECDHis
80
60
40
20
0
-20
CONA
chTRA8
b12
Anticorpo competidor

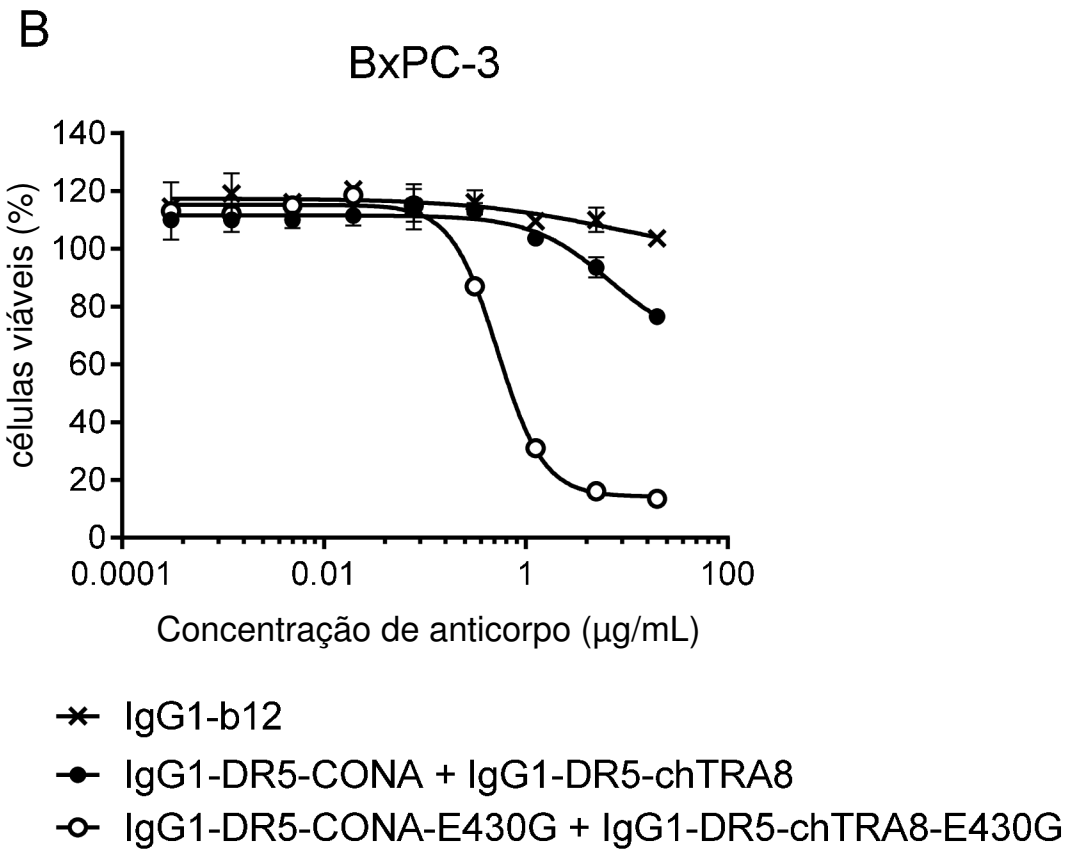

B
BxPC-3
células viáveis (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.01
1
100
Concentração de anticorpo (µg/mL)
IgG1-b12
IgG1-DR5-CONA + IgG1-DR5-chTRA8
IgG1-DR5-CONA-E430G + IgG1-DR5-chTRA8-E430G

Figura 39

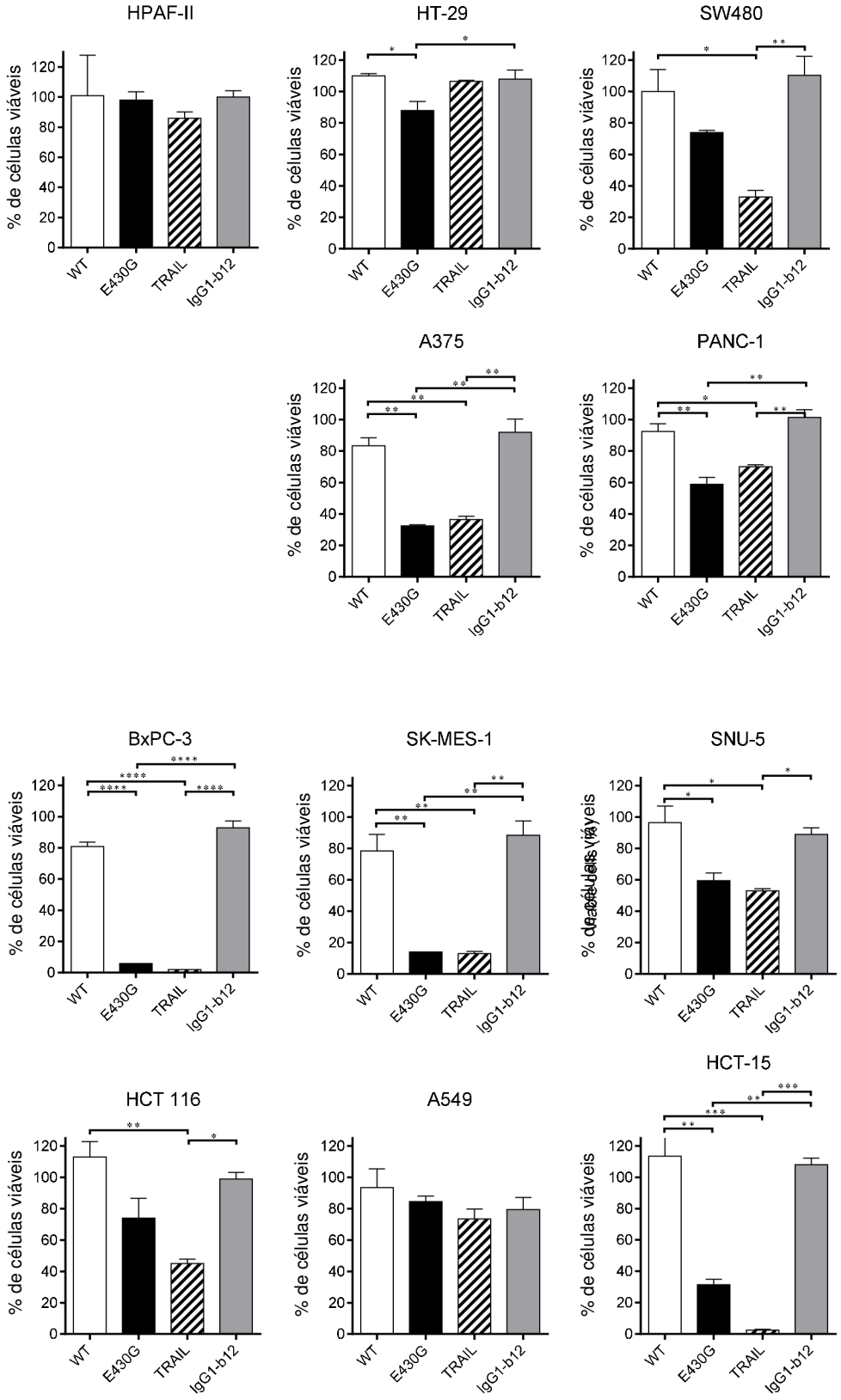

HPAF-II
HT-29
SW480
A375
PANC-1
BxPC-3
SK-MES-1
SNU-5
HCT 116
A549
HCT-15
% de células viáveis
WT
E430G
TRAIL
IgG1-b12

Figura 40

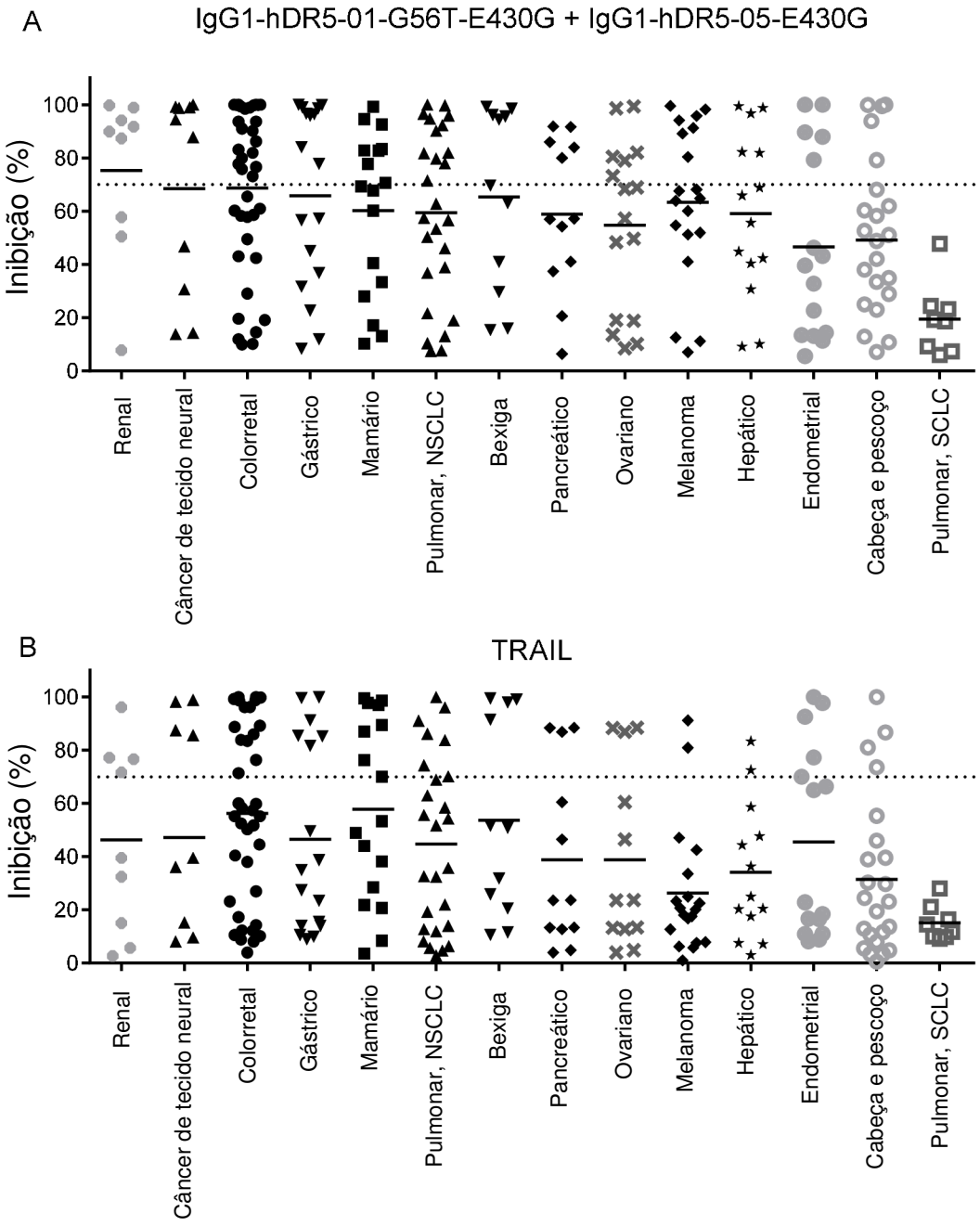

A
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
Inibição (%)
0
20
40
60
80
100
Renal
Câncer de tecido neural
Colorretal
Gástrico
Mamário
Pulmonar, NSCLC
Bexiga
Pancreático
Ovariano
Melanoma
Hepático
Endometrial
Cabeça e pescoço
Pulmonar, SCLC
B
TRAIL
Inibição (%)
0
20
40
60
80
100
Renal
Câncer de tecido neural
Colorretal
Gástrico
Mamário
Pulmonar, NSCLC
Bexiga
Pancreático
Ovariano
Melanoma
Hepático
Endometrial
Cabeça e pescoço
Pulmonar, SCLC

Figura 41

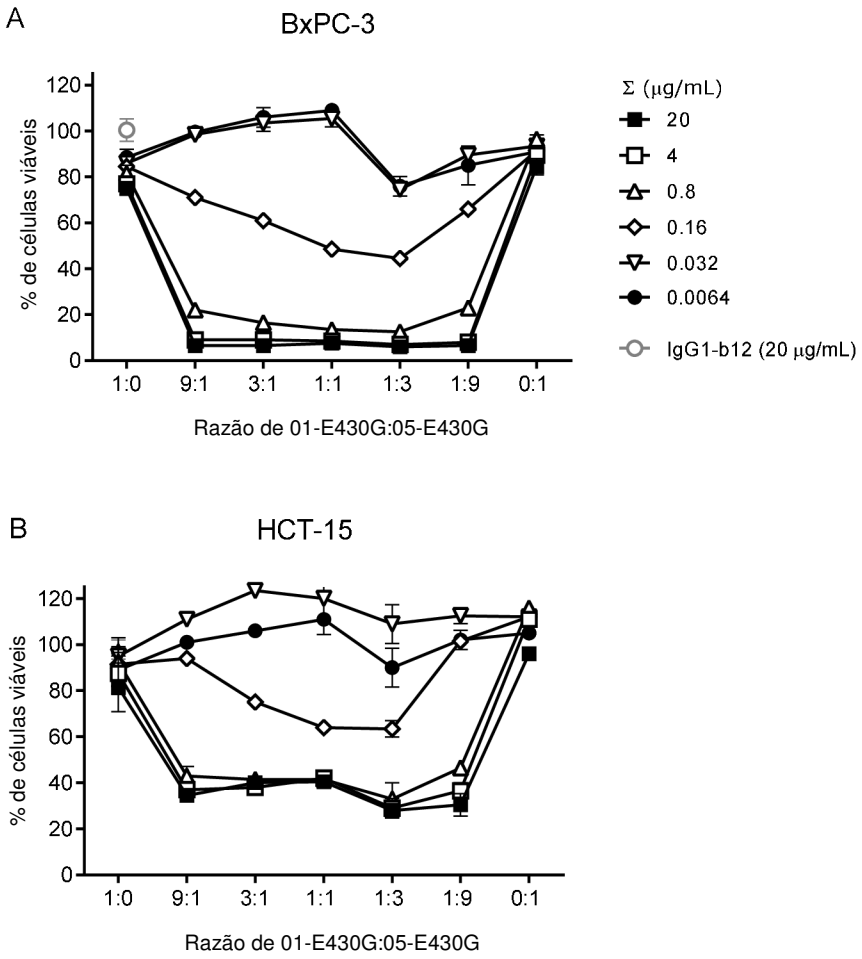

A
BxPC-3
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
1:0
9:1
3:1
1:1
1:3
1:9
0:1
Razão de 01-E430G:05-E430G
Σ (μg/mL)
20
4
0.8
0.16
0.032
0.0064
IgG1-b12 (20 μg/mL)
B
HCT-15
% de células viáveis
120
100
80
60
40
20
0
1:0
9:1
3:1
1:1
1:3
1:9
0:1
Razão de 01-E430G:05-E430G

Figura 42

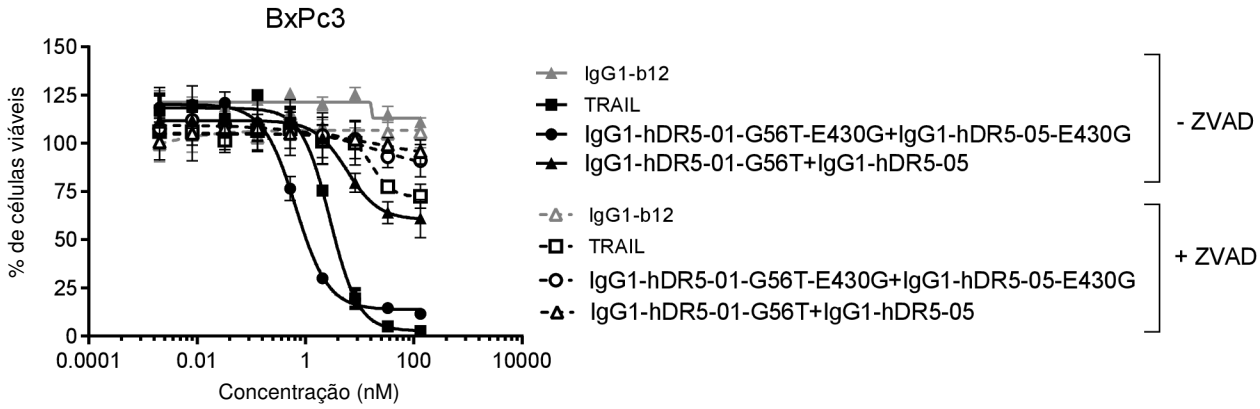

BxPc3
% de células viáveis
150
125
100
75
50
25
0
0.0001
0.01
1
100
10000
Concentração (nM)
IgG1-b12
TRAIL
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T+IgG1-hDR5-05
- ZVAD
IgG1-b12
TRAIL
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T+IgG1-hDR5-05
+ ZVAD

Figura 43

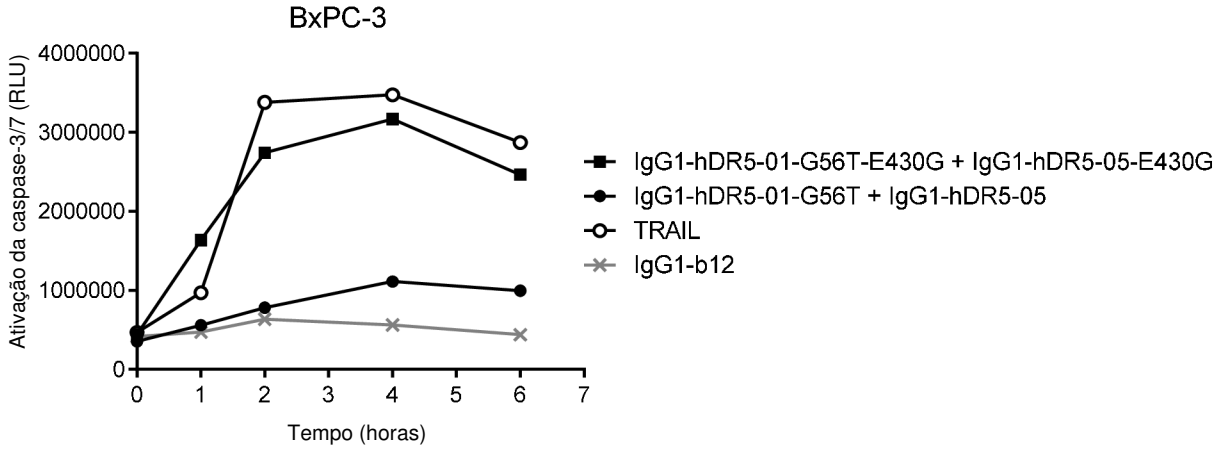

BxPC-3
Ativação da caspase-3/7 (RLU)
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
Tempo (horas)
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
TRAIL
IgG1-b12

Figura 44

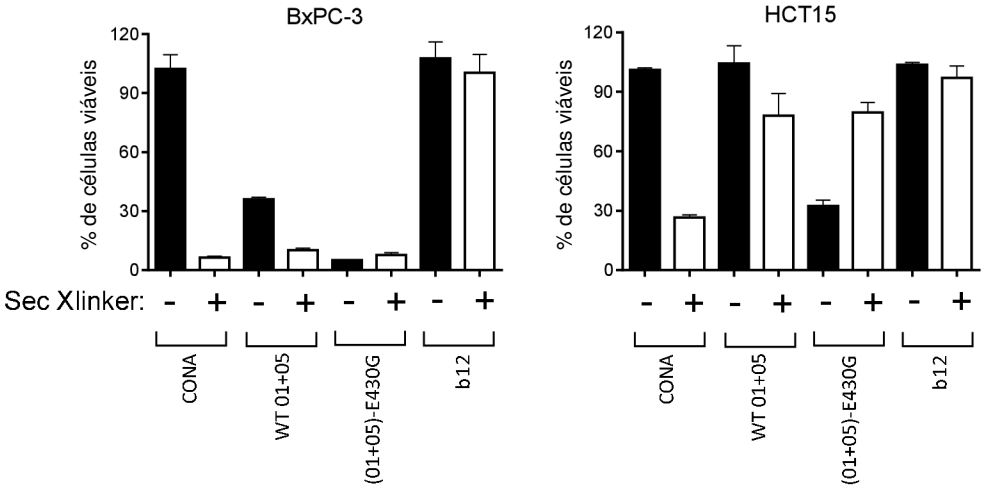

BxPC-3
HCT15
% de células viáveis
120
90
60
30
0
Sec Xlinker: - + - + - + - +
CONA
WT 01+05
(01+05)-E430G
b12

Figura 45

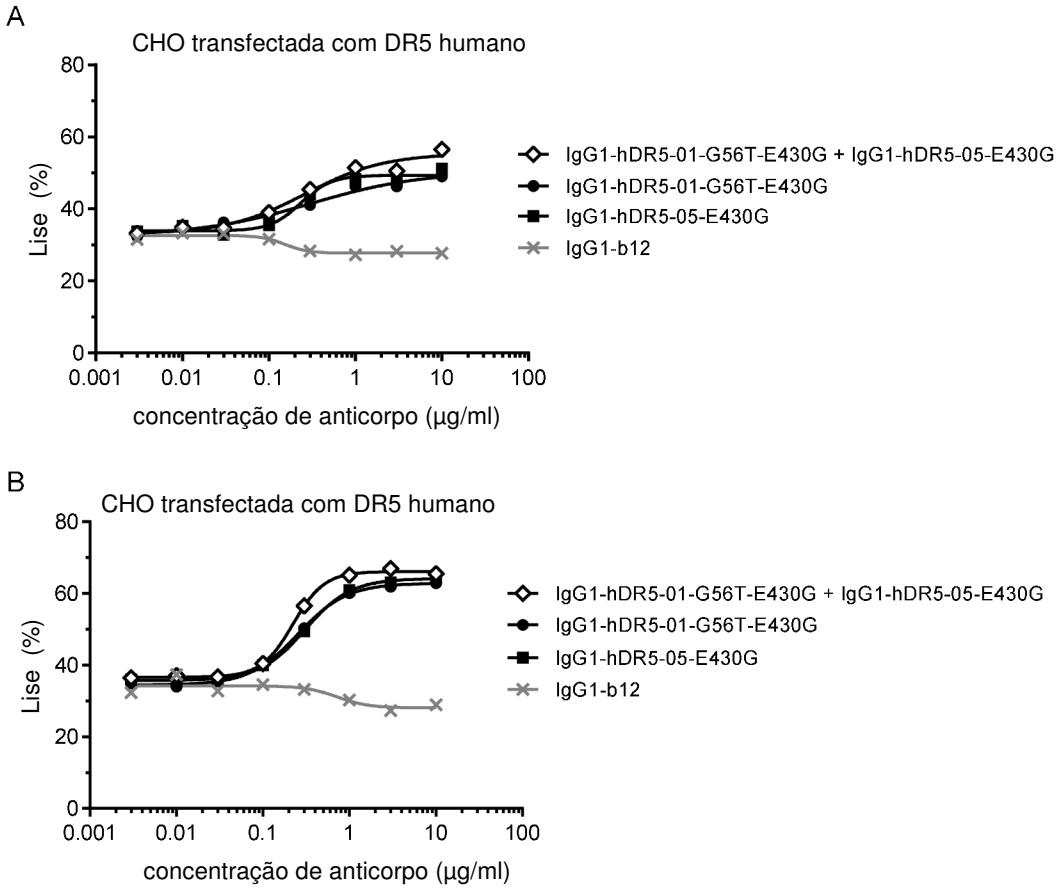

A
CHO transfectada com DR5 humano
Lise (%)
concentração de anticorpo (µg/ml)
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-b12
B
CHO transfectada com DR5 humano
Lise (%)
concentração de anticorpo (µg/ml)
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-b12

Figura 45 continuação

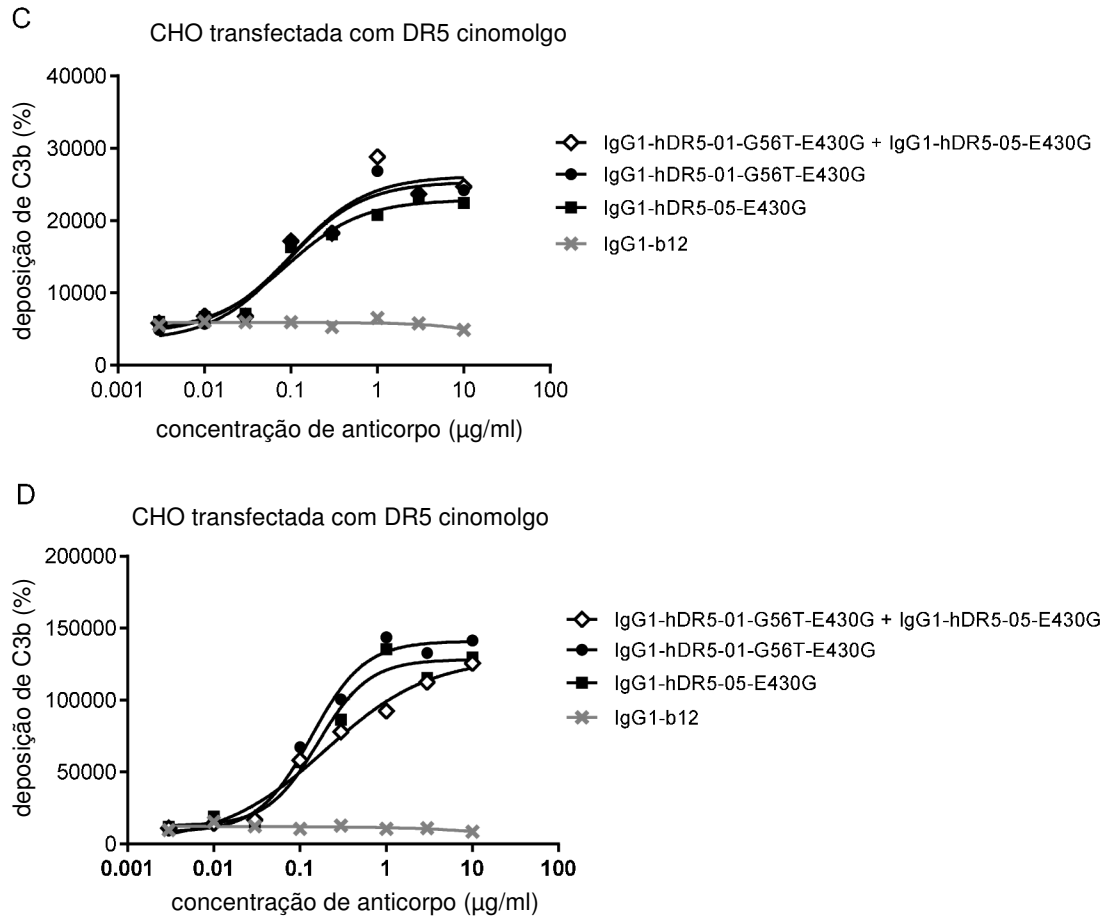


Figura 46

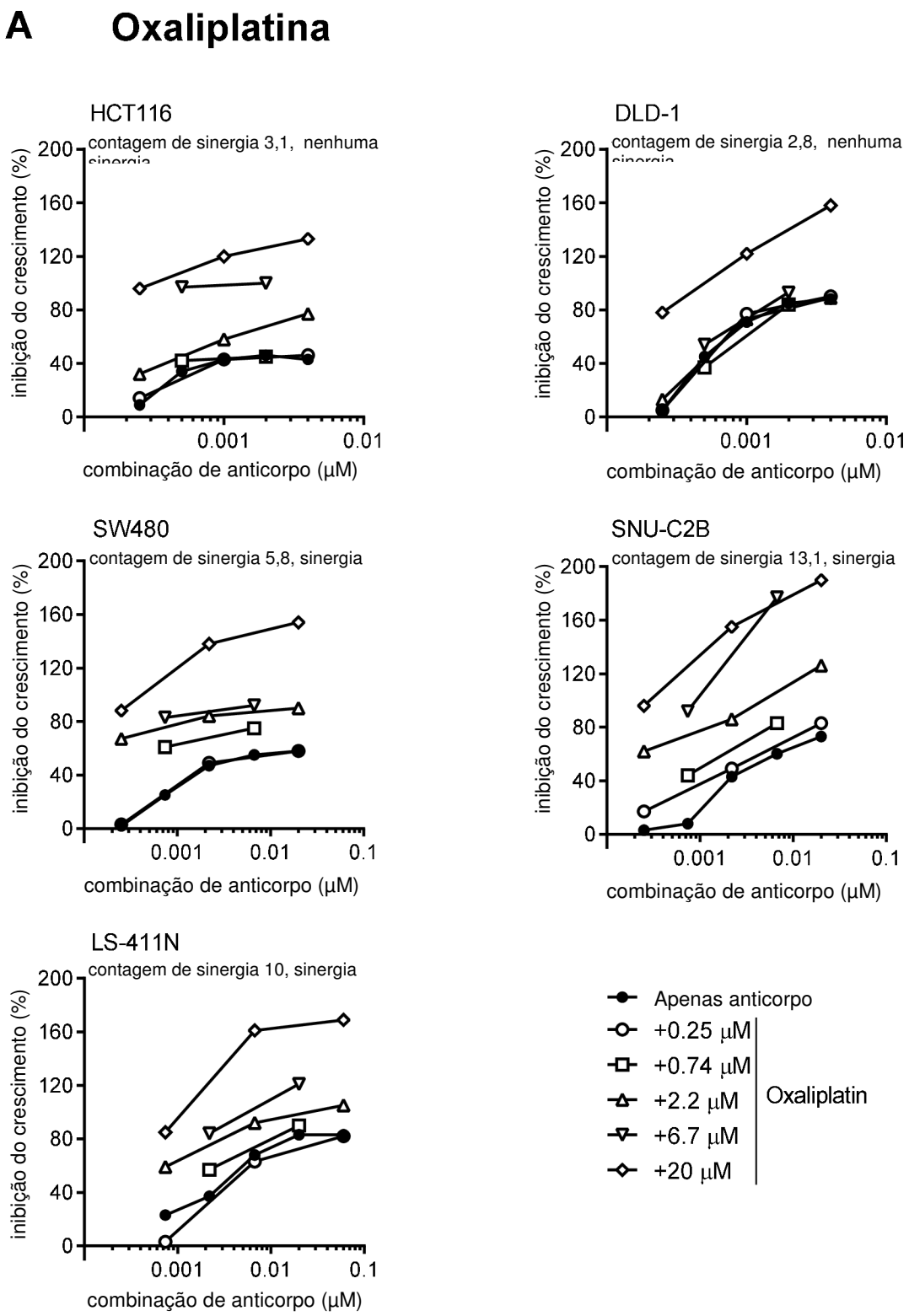

A Oxaliplatina
HCT116
contagem de sinergia 3,1, nenhuma
DLD-1
contagem de sinergia 2,8, nenhuma
SW480
contagem de sinergia 5,8, sinergia
SNU-C2B
contagem de sinergia 13,1, sinergia
LS-411N
contagem de sinergia 10, sinergia
inibição do crescimento (%)
combinação de anticorpo (μM)
Apenas anticorpo
+0.25 μM
+0.74 μM
+2.2 μM
+6.7 μM
+20 μM
Oxaliplatin

Figura 46 continuação

B Irinotecano

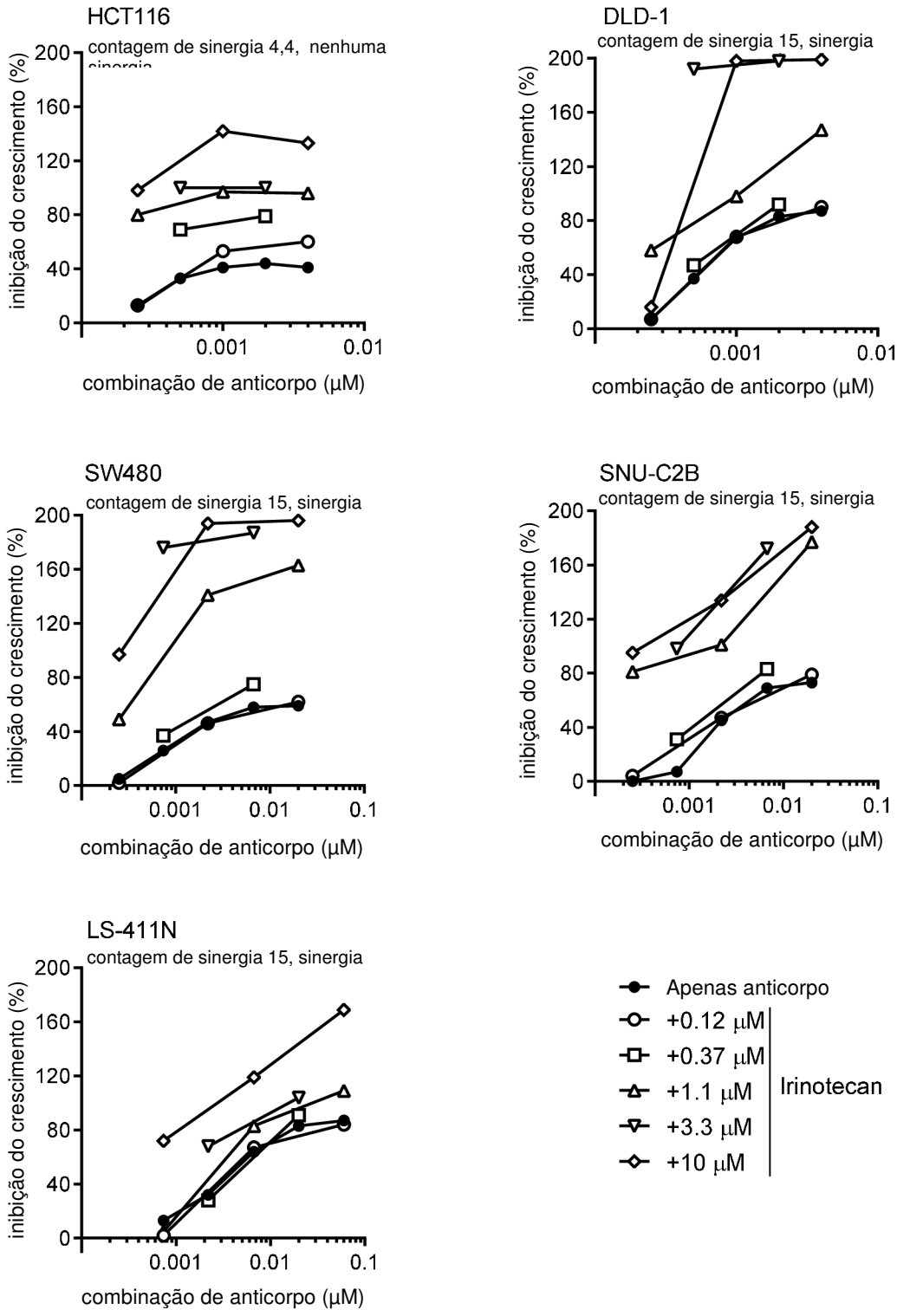


Figura 46 continuação

C Birinapant

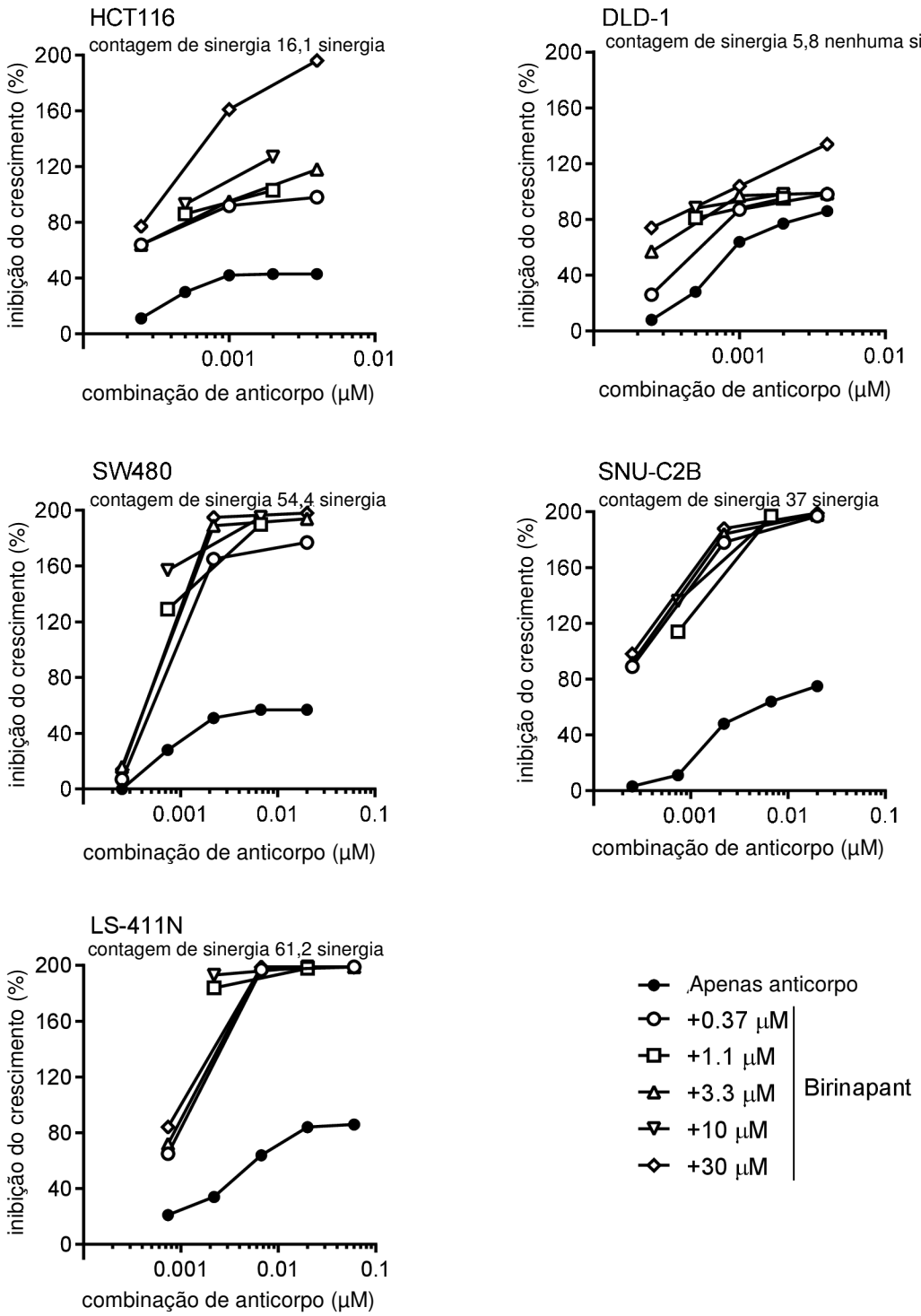


Figura 46 continuação

D Baricitinib

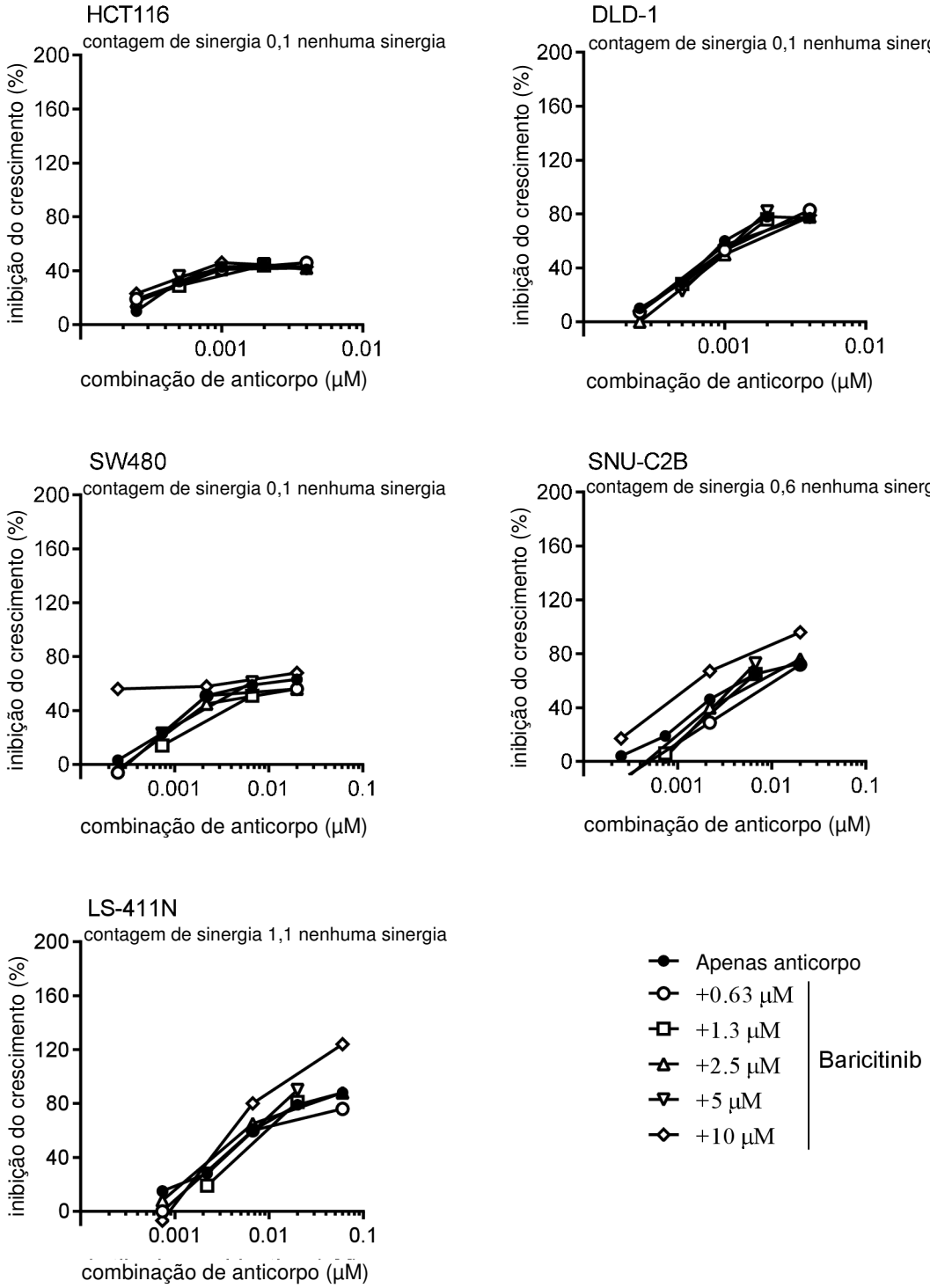


Figura 46 continuação

E Paclitaxel

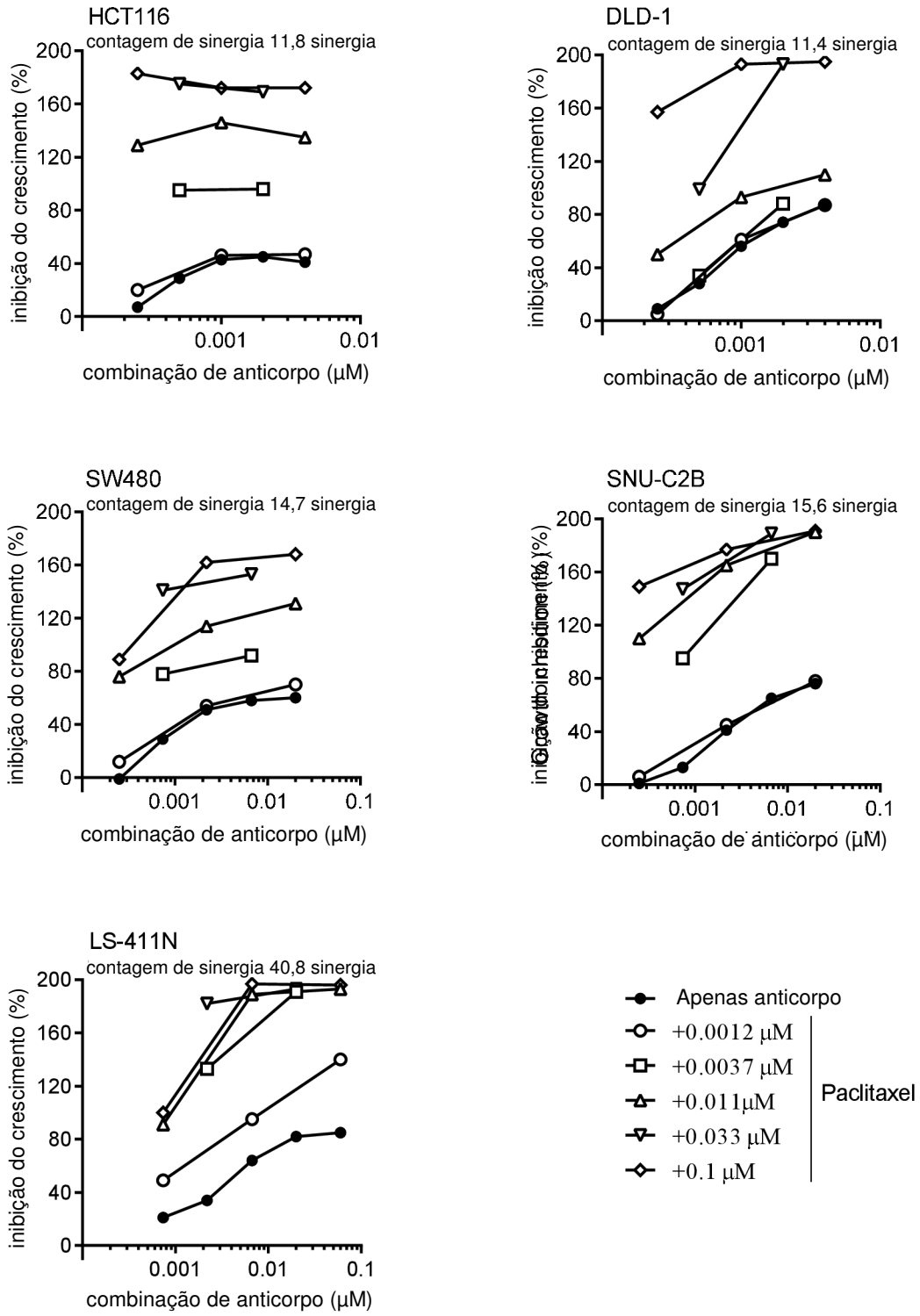
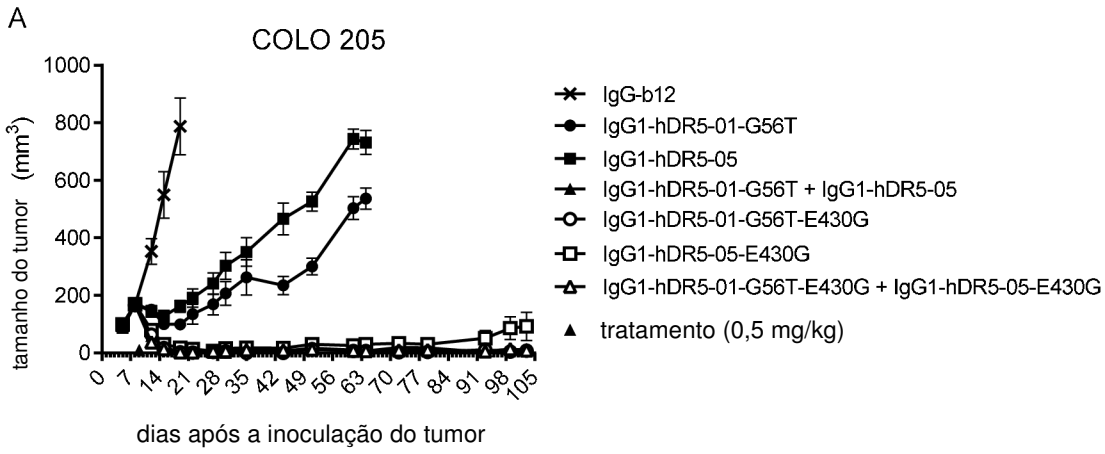


Figura 47


A
COLO 205
tamanho do tumor (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105
dias após a inoculação do tumor
IgG-b12
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
tratamento (0,5 mg/kg)

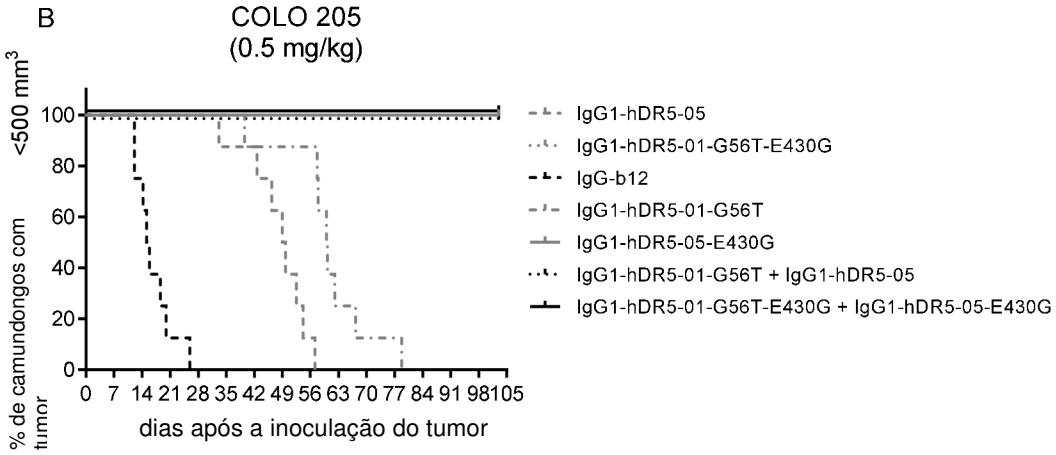

B
COLO 205
(0.5 mg/kg)
<500 mm3
% de camundongos com tumor
100
80
60
40
20
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98105
dias após a inoculação do tumor
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG-b12
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G

Figura 48

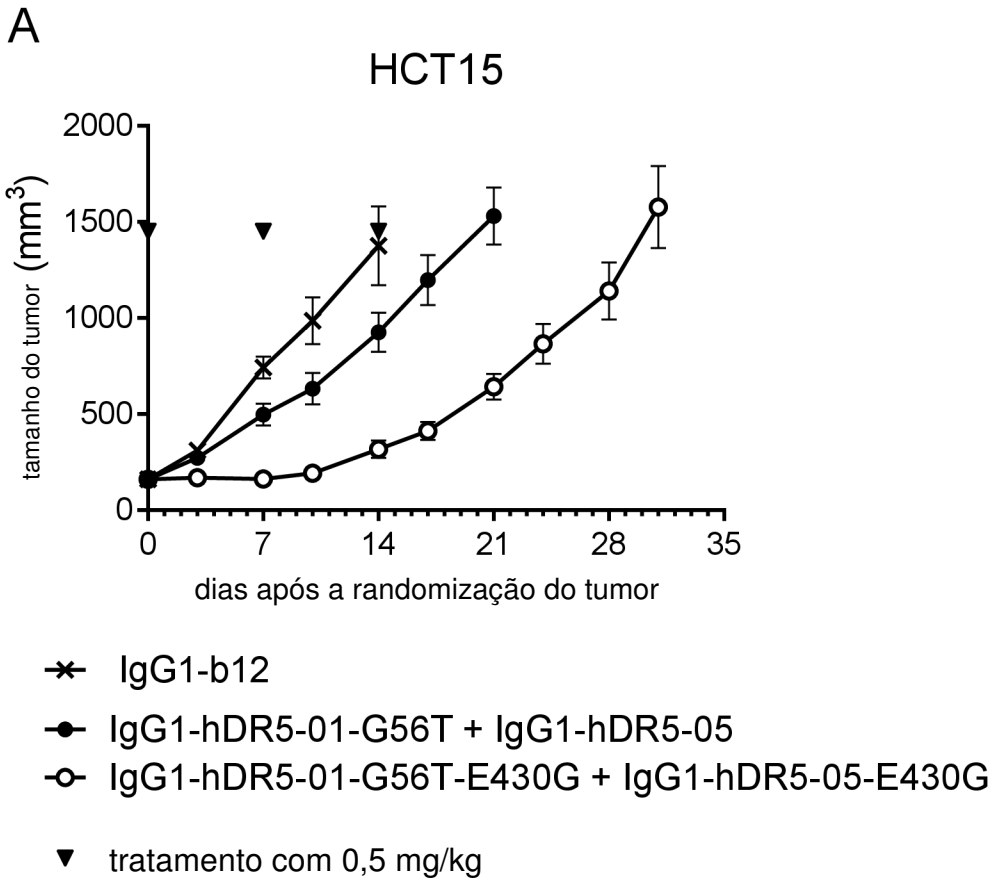

A
HCT15
tamanho do tumor (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
dias após a randomização do tumor
IgG1-b12
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
tratamento com 0,5 mg/kg

Figura 48 continuação

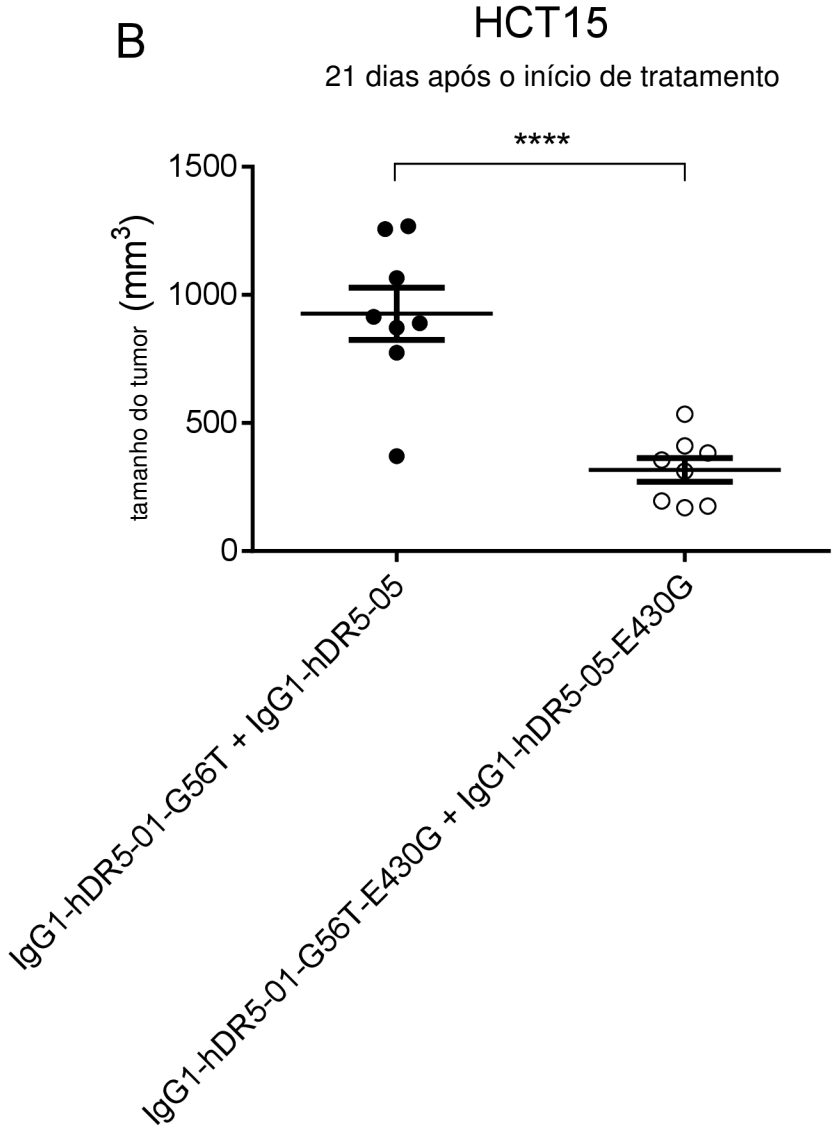


Figura 48 continuação

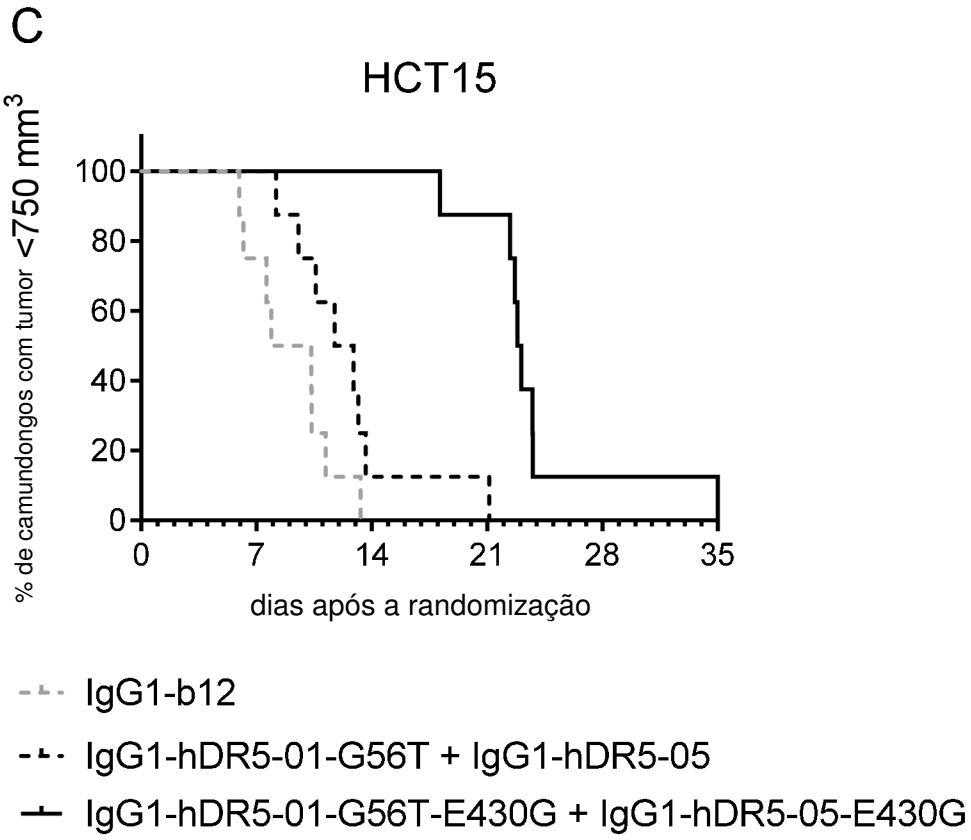


Figura 49

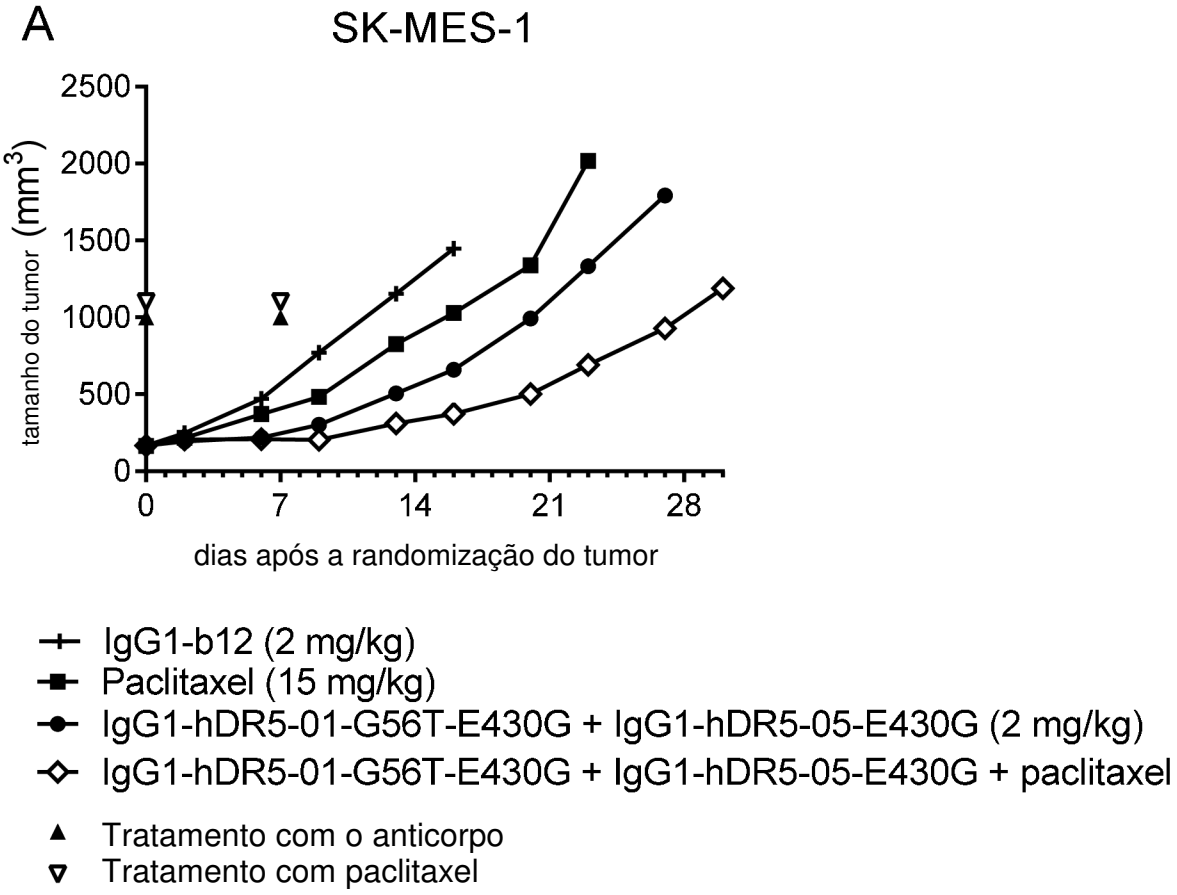

A
SK-MES-1
tamanho do tumor (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
dias após a randomização do tumor
IgG1-b12 (2 mg/kg)
Paclitaxel (15 mg/kg)
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (2 mg/kg)
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G + paclitaxel
Tratamento com o anticorpo
Tratamento com paclitaxel

Figura 49 continuação

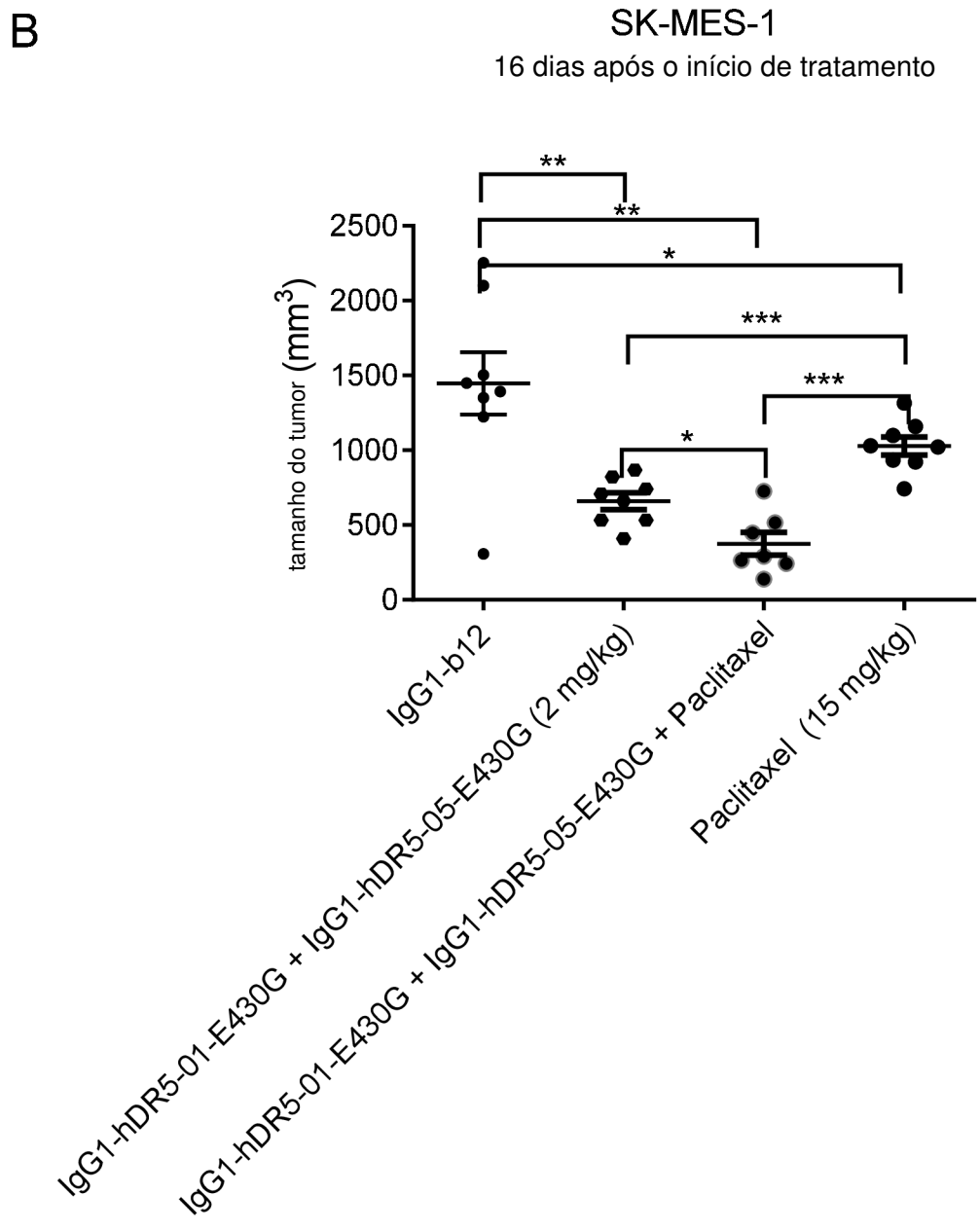


Figura 49 continuação

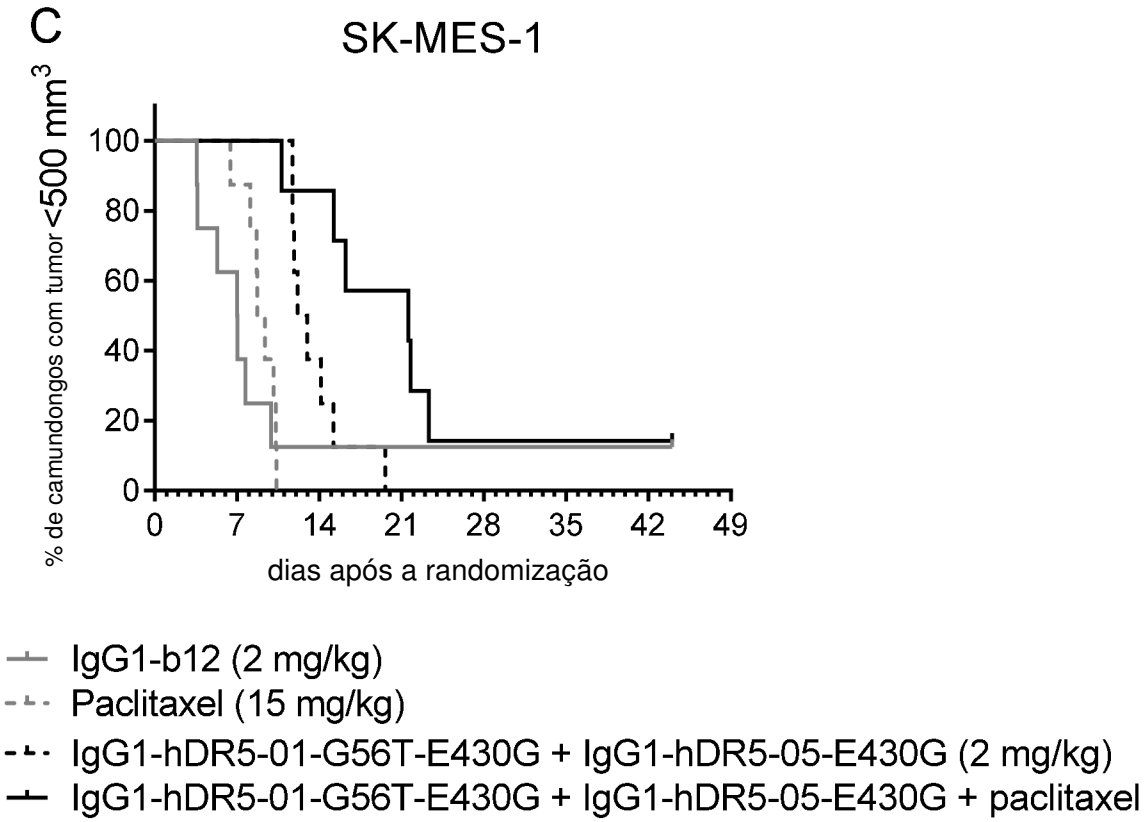


Figura 50

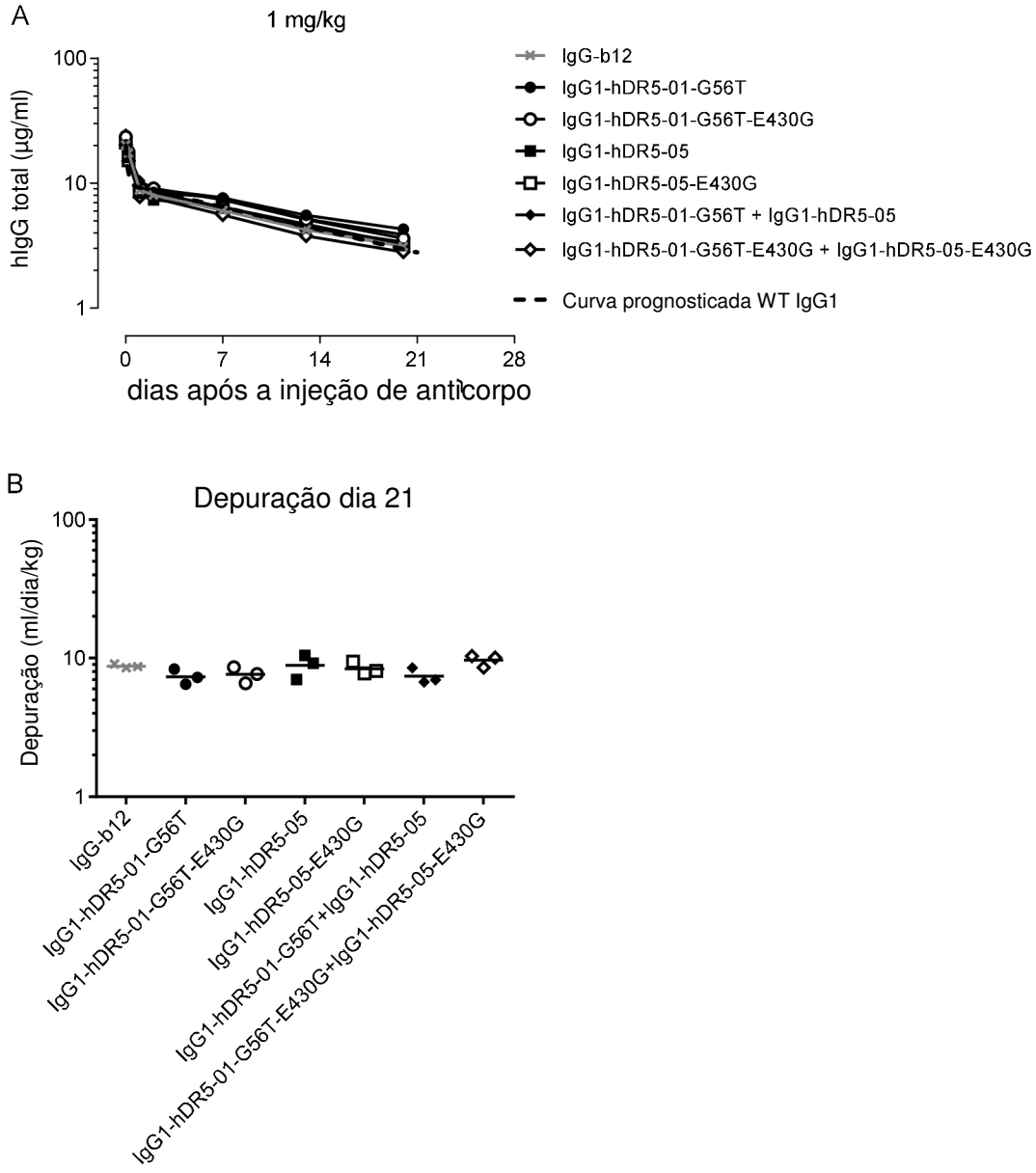
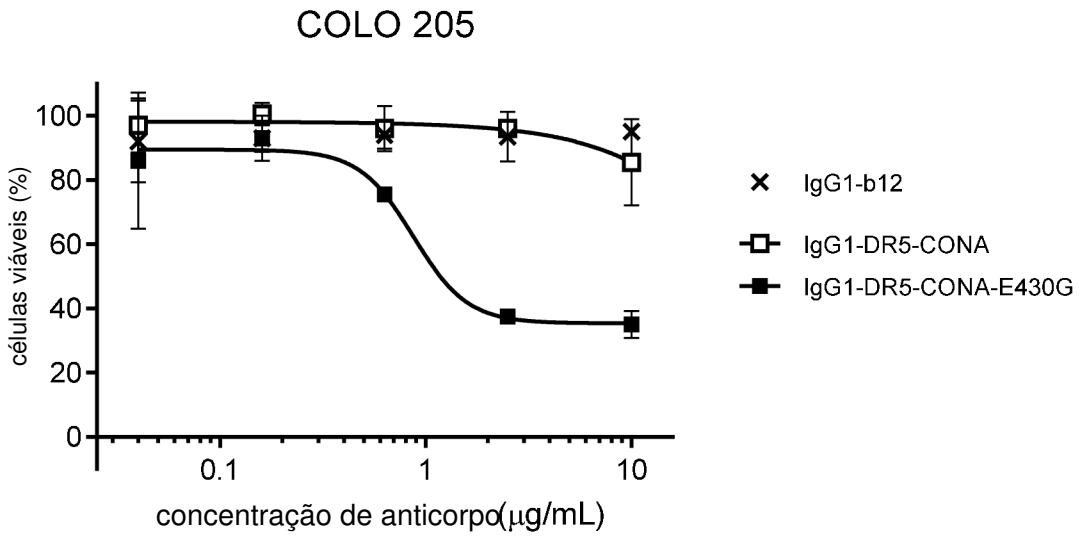

A
1 mg/kg
hIgG total (µg/ml)
100
10
1
0
7
14
21
28
dias após a injeção de anticorpo
IgG-b12
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G
Curva prognosticada WT IgG1
B
Depuração dia 21
Depuração (ml/dia/kg)
100
10
1
IgG-b12
IgG1-hDR5-01-G56T
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G
IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-05-E430G
IgG1-hDR5-01-G56T+IgG1-hDR5-05
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G

Figura 51


COLO 205
células viáveis (%)
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
concentração de anticorpo(μg/mL)
IgG1-b12
IgG1-DR5-CONA
IgG1-DR5-CONA-E430G

RESUMO

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO TENDO UM CÂNCER E PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, KIT DE PARTES

A presente invenção se refere à formulação de anticorpos. A invenção se refere em particular às composições farmacêuticas compreendendo uma molécula de anticorpo do isótipo IgG1 tendo uma mutação na região Fc que realça o agrupamento de moléculas de IgG depois da ligação a antígeno na superfície celular.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P139922 - list seq.txt
- Data de Geração do Código: 22/01/2020
- Hora de Geração do Código: 11:14:23
- Código de Controle:
  - Campo 1: ABCB26154007B102
  - Campo 2: 8EE3C08226A6CD64